

Intrazelluläre Komponenten des IL-1-Rezeptorkomplexes

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von
Gudrun Sacht
aus Braunschweig

1. Referent:	Prof. Dr. L. Flohé
2. Referent:	Priv.-Doz. Dr. M. Singh
eingereicht am:	19.03.1998
mündliche Prüfung am:	9.07.1998
Druckjahr:	1998

Die vorliegende Arbeit wurde unter der wissenschaftlichen Anleitung von Prof. Dr. L. Flohé in der Zeit vom März 1995 bis März 1998 in der Arbeitsgruppe "Physiologische Chemie" (IPC) der Technischen Universität Braunschweig durchgeführt.

Bei Herrn Prof. Dr. L. Flohé möchte ich mich für die interessante Themenstellung, die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und die ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn Dr. M. Singh danke ich für die bereitwillige Übernahme der Korreferates.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. H. Sztajer für die zahlreichen interessanten und motivierenden Gespräche sowie für die gute Zusammenarbeit. Frau K. Plank-Schumacher danke ich für die Durchführung der DNA-Sequenzierungen. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. P. Steinert, Herrn Dr. J. Wissing und allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe IPC und der "umliegenden Labore" in der GBF (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig-Stöckheim) für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft bedanken.

Weiterhin danke ich Frau Prof. Dr. R. Brigelius-Flohé und allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe "Vitamine und Atherosklerose" am Deutschen Institut für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, das schöne Arbeitsklima und die interessanten Diskussionen. Besonders möchte ich mich hier bei Herrn Dr. R. Streicher und Frau Dr. B. Friedrichs für die hilfreichen Anregungen bedanken.

Bei Herrn Dr. M. Martin und Herrn H. Wesche von der Medizinischen Hochschule Hannover bedanke ich mich für die Bereitstellung von Zellen sowie die praktischen Tips zur Durchführung der Immunopräzipitationen. Für die Unterstützung bei der Durchführung der Fermentationen danke ich Herrn Dr. R. Wagner und den Mitarbeitern der Abteilung "Zellkulturtechnik" der GBF. Bei Herrn Dr. P. Paulsen (GBF) möchte ich mich für die Bereitstellung von Interleukin-1 bedanken. Außerdem gilt mein Dank Herrn Dr. M. Kieß (GBF) für die Durchführung der Proteinsequenzierungen und Dr. M. Rohde (GBF) für die immunohistochemischen Analysen.

An dieser Stelle möchte ich auch Heidi und meinem Vater für ihre liebevolle Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit meinen Dank aussprechen.

Inhalt

Abkürzungen

1 Einleitung	1
1.1 Interleukin-1	1
1.2 Die biologischen Wirkungen von Interleukin-1	2
1.3 Die intrazellulären Effekte von Interleukin-1	3
1.4 Die IL-1-Rezeptoren	4
1.5 Der Signaltransduktionskomplex	6
2 Material und Methoden	9
2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	9
2.2 Geräte	10
2.3 Arbeiten mit eukaryontischen Zellen	11
2.3.1 Zelllinien	11
2.3.2 Sterilisieren	11
2.3.3 Kulturmedien und Lösungen	11
2.3.4 Kultivierung von Zellen	13
2.3.5 Zellzahlbestimmung	13
2.3.6 Kryokonservierung von Zellen	14
2.3.6.1 Einfrieren von Zellen	14
2.3.6.2 Auftauen von Zellen	14
2.3.7 Fermentation	14
2.3.8 Stimulierung der Zellen	15
2.3.9 Zellernte und Aufschluß der Zellen	16
2.3.10 Transfektion	16
2.3.10.1 Liposomentransfektion	16
2.3.10.2 Elektroporation	17
2.3.11 Selektion und Isolierung von stabilen Transfektanten	17
2.3.12 Messung der β -Galaktosidase	18
2.3.12.1 Messung im Zellextrakt	18
2.3.12.2 Galaktosidasefärbung von Zellen	19
2.4 Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	20
2.4.1 Stämme	20
2.4.2 Sterilisieren	20
2.4.3 Kulturmedien und Antibiotikallösungen	20
2.4.4 Anzucht von Bakterien	21
2.4.5 Konservierung von Bakterien	21
2.4.6 Herstellung von kompetenten Zellen	21
2.4.7 Hitzeschock-Transformation	22
2.4.8 <i>Blue/white-Screening</i>	22
2.5 Arbeiten mit Proteinen	23
2.5.1 Proteinbestimmung	23

2.5.2	SDS-Gelelektrophorese	23
2.5.3	Proteintransfer auf Membranen	26
2.5.3.1	<i>Semi Dry Blotting</i>	26
2.5.3.2	Tank-Transfer	26
2.5.4	Proteinfärbungen	27
2.5.4.1	Coomassieblau-Färbung	27
2.5.4.2	Silbernitrat-Färbung	28
2.5.4.3	Ponceaurot-Färbung	29
2.5.5	Konservierung von Polyacrylamid-Gelen	30
2.5.6	Western-Blot	30
2.5.7	Immunopräzipitation	31
2.5.8	Kinasemessung	33
2.5.8.1	Kinasetest mit SDS-Gelelektrophorese	33
2.5.8.2	Kinasetest mit Phosphocellulose-Einheiten	33
2.5.9	<i>In vitro</i> -Behandlungen des Immunopräzipitates	34
2.5.9.1	FSBA-Behandlung	34
2.5.9.2	Behandlung mit Nukleotiden	35
2.5.10	ICAM-Färbung	35
2.5.11	Statistische Auswertung	36
2.5.12	Proteinsequenzierung	36
2.5.13	Herstellung von polyklonalen Antikörpern	37
2.5.14	Immunohistochemie	37
2.5.14.1	Immunoelektronen-Mikroskopie	37
2.5.14.2	Immunofluoreszenz-Mikroskopie	38
2.6	Arbeiten mit Nukleinsäuren	39
2.6.1	Sterilisieren	39
2.6.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	39
2.6.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40
2.6.4	Präparation von Gesamt-RNA	41
2.6.4.1	RNA-Isolierung aus <i>Current Protocols in Molecular Biology</i>	41
2.6.4.2	RNA-Isolierung mit Tri-Reagenz	42
2.6.5	Extraktion mit Phenol/Chloroform	42
2.6.6	Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren	43
2.6.7	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	43
2.6.8	DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen	44
2.6.9	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	44
2.6.10	5'-Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	45
2.6.11	Ligation	45
2.6.12	TA-Klonierung	46
2.6.13	Reverse Transkription	47
2.6.14	Polymerasekettenreaktion	48
2.6.15	Agarose/Formaldehyd-Gelelektrophorese von RNA	49
2.6.16	Kapillartransfer von RNA	49
2.6.17	Färbung von RNA-Größenstandards	50
2.6.18	Northern-Hybridisierung	50

2.6.18.1 Markierung der RNA-Sonde durch <i>in vitro</i> -Transkription	51
2.6.18.2 Hybridisierung und Waschen	52
2.6.18.3 Detektion	53
2.6.19 DNA-Sequenzierung	53
2.6.19.1 Dideoxyterminations-Sequenzierung mit markiertem dATP	54
2.6.19.2 Zyklus-Sequenzierung mit Fluoreszenz-markierten Terminatoren	56
2.6.20 DNA- und RNA-Längenstandards	57
2.6.20.1 DNA-Marker	57
2.6.20.2 RNA-Marker	57
2.6.21 Vektoren	57
2.6.22 Oligonukleotide	58
3 Ergebnisse	60
3.1 Die am IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase	60
3.1.1 Am IL-1-Rezeptor von murinen und humanen Zelllinien ist eine durch IL-1 stimulierbare Kinase assoziiert	60
3.1.2 Das ATP-Analog Fluorosulfonylbenzoyladenosenin hemmt die Kinaseaktivität am IL-1-Rezeptor	67
3.2 Das Immunopräzipitat des IL-1-Rezeptors	72
3.2.1 Das Immunopräzipitat besteht aus einem Komplex von Proteinen	72
3.2.2 Mehrere Proteine des IL-1-Rezeptorkomplexes werden partiell sequenziert	74
3.3 Das am IL-1-Rezeptor assoziierte Protein p74	78
3.3.1 p74 aus Mauszellen wird kloniert und sequenziert	78
3.3.2 p74 ist Mortalin sehr ähnlich und wird Mot-3 genannt	79
3.3.3 Mortalin wird in verschiedenen Zelllinien exprimiert	83
3.4 Der Antikörper gegen Mortalin	85
3.4.1 Zur Verfügung stehende Antikörper sind nicht spezifisch für Mortalin	85
3.4.2 Es wird ein spezifischer Antikörper gegen Mortalin produziert	86
3.4.3 Die am IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase läßt sich nicht durch den Antikörper gegen Mortalin isolieren	86
3.5 Die <i>in vitro</i> -Dissoziation von Mortalin aus dem IL-1-Rezeptorkomplex	88
3.5.1 Durch Inkubation mit ATP dissoziiert Mortalin aus dem IL-1-Rezeptorkomplex	88
3.5.2 Die <i>in vitro</i> -Dissoziation ist spezifisch für ATP	90
3.5.3 Die <i>in vitro</i> -Dissoziation von Mortalin aus dem Rezeptorkomplex hat keinen Einfluß auf die am IL-1-Rezeptor assoziierte Kinaseaktivität	92
3.6 Der <i>Sense/Antisense</i> -Ansatz	94
3.6.1 Die Transfektionsversuche mit EL4-6.1	94
3.6.2 Die durch IL-1 induzierbare Expression von Adhäsionsmolekülen als <i>Read out</i> -System für die humane Endothelzelllinie ECV-304	95
3.6.3 Das <i>Antisense</i> -Konstrukt für Humanzellen	97
3.6.4 Das <i>Antisense</i> -Konstrukt wird stabil in die Endothelzelllinie ECV-304 integriert	98
3.6.5 In einigen Klonen läßt sich die <i>Antisense</i> -RNA nachweisen	99

3.6.6	Die <i>Antisense</i> -Klone exprimieren nicht weniger Mortalin auf Proteinebene als die Kontrollzellen	100
3.6.7	Einige <i>Antisense</i> -Klone zeigen eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber IL-1	100
3.7	Der <i>Dominant/Negative</i> -Ansatz	103
3.7.1	Die Konstrukte zur Überexpression der Substraterkennungsdomäne und der ATPase-Domäne	104
3.7.2	Die DNA der Substraterkennungsdomäne und der ATPase-Domäne wird stabil in ECV-304 integriert	104
3.7.3	Bei einigen Klonen wird die eingeführte DNA in großer Menge transkribiert	104
3.7.4	Die Transkription der eingeführten DNA bleibt über einen längeren Zeitraum konstant	106
3.7.5	Das durch die eingeführte DNA codierte Protein ist nicht nachzuweisen	107
3.7.6	Die Klone mit Substraterkennungsdomäne sind in der durch IL-1 induzierbaren Expression von Adhäsionsmolekülen unverändert	110
3.7.7	Einige der Klone mit ATPase-Domäne zeigen eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber IL-1 bei der induzierbaren Expression von Adhäsionsmolekülen	111
3.8	Die Lokalisation von Mortalin	113
3.8.1	Mortalin läßt sich in den Mitochondrien nachweisen	113
4	Diskussion	118
4.1	Die rezeptorassoziierte Kinase	118
4.2	Komponenten der IL-1-Rezeptorkomplexes	123
4.2.1	HnRNP	123
4.2.2	TLS/FUS	124
4.2.3	Mortalin	125
4.3	Der Antikörper gegen Mortalin	129
4.4	Die <i>in vitro</i> -Dissoziation von Mortalin	130
4.5	Der Versuch einer funktionellen Analyse von Mortalin	132
4.5.1	Der <i>Sense/Antisense</i> -Ansatz	133
4.5.2	Der <i>Dominant/Negative</i> -Ansatz	135
4.6	Die Lokalisation von Mortalin	139
4.7	Schlußbetrachtung und Ausblick	142
5	Zusammenfassung	145
6	Literaturverzeichnis	148
7	Anhang	I
7.1	Auflistung der verschiedenen <i>E. coli</i> -Klone	I
7.2	Abkürzungen in den Bezeichnungen der eukaryontischen Zellklone	I
7.3	Sequenzen	II

Abkürzungen

Gängige Abkürzungen für allgemein gültige Begriffe, physikalische Größen und SI-Einheiten (*Systeme International D'Unites*) wurden nicht in das Abkürzungsverzeichnis aufgenommen.

A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure (oder <i>Antisense</i>)
ATP	Adenosintriphosphat (oder ATPase-Domäne)
ATPase	Adenosintriphosphatase
BCA	<i>bicinchonic acid</i>
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
β-Gal	β-Galaktosidase
Bis	N,N-Methylenbisacrylamid
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cpm	<i>counts per minute</i>
CTP	Cytidintriphosphat
ddNTP	Dideoxynukleosidtriphosphat
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat
ERK	<i>extracellular signal-regulated protein kinase</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSBA	5'-(4-Fluorosulfonylbenzoyl)adenosin
GTP	Guanosintriphosphat
H1	Histon-1
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IL-1	Interleukin-1
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IL-1ra	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
IP	Immunopräzipitat
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilo-Basenpaare

Abkürzungen

kD	Kilo-Dalton
LMW	<i>low molecular weight</i>
M	Marker
MAP	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MBP	<i>myelin basic protein</i>
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
Mot	Mortalin
NBT	<i>nitro blue Tetrazolium</i>
OD _{578 nm}	Optische Dichte bei 578 nm
ONPG	Ortho-Nitrophenyl-D-Galaktopyranosid
PBP	<i>peptide binding protein</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PIPES	Piperazin-N,N'-bis[ethansulfonsäure]; 1,4-Piperazin-diethansulfonsäure
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
R	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SUB	Substraterkennungsdomäne
T	Zellkulturflasche
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRICINE	N-tris[hydroxymethyl]methylglycine; N-[2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
U	<i>forward</i>
upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
V	leerer Vektor
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktosid

1 Einleitung

1.1 Interleukin-1

Interleukine sind kleine, hoch aktive Moleküle, die zur Gruppe der Zytokine gehören. Das Wirkungsfeld der meisten Zytokine liegt nicht in der Kontrolle der Zell-Homöostase sondern in den regulatorischen Maßnahmen, die bei einer Störung des Gleichgewichts oder bei auftretenden Veränderungen notwendig werden.

Interleukin-1 (IL-1) war eines der ersten beschriebenen Zytokine und wurde u. a. im Zusammenhang mit Fieberauslösung (um 1940), mit degenerativen Gelenkserkrankungen und mit Blutbildung diskutiert. Daraus ergaben sich verschiedene Bezeichnungen für dieselbe Substanz, wie z. B. endogenes Pyrogen oder Hämatopoetin-1. IL-1 wurde als biologische Aktivität aus Kulturüberständen von Makrophagen isoliert, die die Proliferation von aktivierten T-Lymphozyten verstärkte. Diese Eigenschaft drückt sich in der Bezeichnung LAF (*lymphocyte activating factor*) aus [zusammengefaßt in 38]. Der Ausdruck Interleukin-1 wurde erst später geprägt und bezieht sich auf den Botenstoff, der zwischen Leukozyten vermittelt, also Interleukin. Mit der Zeit zeigte sich jedoch, daß die Wirkung von IL-1 nicht auf Leukozyten beschränkt ist. Inzwischen sind IL-1-Effekte für nahezu jedes Gewebe und jedes Organ beschrieben [zusammengefaßt in 38].

1984 gelang die Klonierung von zwei Formen des Interleukin-1: IL-1 α [101] und IL-1 β [7]. Beide Formen zeigen nur 26% Identität auf Aminosäureebene, sind also biochemisch verschieden, obwohl sie die gleichen Oberflächenrezeptoren binden und in ihrer biologischen Wirkung sehr ähnlich sind. IL-1 wird, außer von Makrophagen, von einer Vielzahl verschiedener Zelltypen nach deren Aktivierung freigesetzt und führt zu sehr diversen biologischen Effekten. Zusammenfassend kann IL-1 als proinflammatorisches Zytokin bezeichnet werden. Zu dieser Gruppe zählen außerdem IL-6 und TNF (*tumor necrosis factor*). Besonders TNF hat ein sehr ähnliches Wirkungsprofil wie IL-1. Andere Zytokine, wie z. B. IL-4, IL-10, IL-13 und TGF β (*transforming growth factor*), scheinen diesen entzündungsfördernden Mediatoren entgegenzuwirken. 1985 wurde das dritte Mitglied der IL-1-Familie identifiziert: der natürlich vorkommende Rezeptorantagonist IL-1ra [4, 8]. Die Klonierung und Sequenzierung dieses Proteins erfolgte 1990 [46]. Der Rezeptorantagonist ist auf Aminosäureebene zu 26% mit IL-1 β und zu 19% mit IL-1 α identisch. Das Molekül bindet die IL-1-Rezeptoren und ist in der Lage, die IL-1-Effekte *in vitro* und *in vivo* zu blockieren [zusammengefaßt in 5].

In gesunden Zellen ist normalerweise keine mRNA für IL-1 nachzuweisen, doch unter entsprechenden Bedingungen steigt die Synthese von IL-1 drastisch an. Eine erhöhte IL-1-Produktion ist in Patienten mit verschiedenen Infektionen, Tumoren, Leukämie, Asthma und Autoimmunerkrankungen festzustellen. Der am stärksten verbreitete Stimulus für die IL-1-Synthese ist Endotoxin, aber auch andere mikrobielle Produkte, sowie Komponenten des Komplement-Systems, Thrombin oder Zytokine induzieren die Synthese von IL-1 in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen [38].

1.2 Die biologischen Wirkungen von Interleukin-1

IL-1 spielt bei Immunreaktionen und Entzündungsprozessen eine zentrale Rolle. So wirkt das Zytokin auf die Proliferation von T-Zellen [58], auf die Thymozytenreifung [36], auf die T-Zell-Aktivierung [51], auf die B-Zell-Proliferation [77] und auf die Synthese und Oberflächenexpression von Immunglobulinen [63]. Durch IL-1 wird die Synthese und die Sekretion von hämatopoetischen Faktoren angeregt [183, 184]. Das Wachstum von hämatopoetischen Vorläuferzellen wird durch IL-1 stimuliert [74]. Auch in nicht-lymphoiden Zellen sind IL-1-Effekte nachzuweisen, so wird z. B. in Bindegewebszellen die Prostaglandin- und Kollagenase-Produktion angeregt [116]. Durch IL-1 wird die Knochenresorption durch Osteoklasten [66] sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen stimuliert [144, 118].

IL-1 ist als entzündungsförderndes Zytokin ein entscheidender Mediator bei der Abwehr von Infektionen. An der Entzündungsstelle wird von den aktivierten Makrophagen IL-1 produziert, welches die antigenspezifische T-Zellantwort moduliert und außerdem dazu führt, daß auf der Oberfläche von Endothelzellen Adhäsionsmoleküle exprimiert werden. Hierdurch können weitere Leukozyten, wie T- und B-Zellen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten direkt an den Entzündungsort gelockt werden. IL-1 induziert die Freisetzung von Kollagenasen und anderen Proteasen, die das Eindringen von Zellen des Abwehrsystems in das entzündete Gewebe ermöglichen. Auch die Symptome des septischen Schocks sind das Ergebnis der Wirkung von endogenen Zytokinen (u. a. IL-1), die durch Endotoxine induziert werden [126]. Die entzündungsfördernde Wirkung von IL-1 beschränkt sich allerdings nicht auf die Abwehr von akuten Infektionen. Bei chronischen, entzündlichen Erkrankungen, wie z. B. rheumatischer Arthritis, spielt IL-1 gleichfalls eine zentrale Rolle. Die Schwere der rheumatischen Attacke korreliert mit dem Spiegel von zirkulierendem IL-1 [45]. In der Tumorbilogie ist IL-1 ebenfalls von Interesse. Verschiedene Krebszellen exprimieren spontan IL-1, was zu einer Förderung des Tumorwachstums und der Metastasierung führt [50, 103]. Andererseits wird auch eine Tumorregression durch die Applikation von IL-1 im Tiermodell beobachtet, was auf unspezifische oder tumorspezifische Mechanismen des Immunsystems zurückzuführen ist, die durch IL-1 angeregt werden [83]. Die Applikation von IL-1 bei Tumorpatienten erbrachte jedoch keine konsistenten Ergebnisse [zusammengefaßt in 41]. Durch den Einsatz des Rezeptorantagonisten IL-1ra zur Verminderung der schädlichen IL-1-Wirkungen wurde im Tiermodell in vielen Fällen eine Reduktion von Krankheitssymptomen festgestellt. IL-1ra muß jedoch in sehr hohen Dosen appliziert werden, da die Halbwertszeit im Plasma nur kurz ist und IL-1ra kaum in das Gewebe eindringt. Klinische Versuche, in denen der Rezeptorantagonist eingesetzt wurde, um die toxischen Wirkungen von IL-1 im septischen Schock zu vermindern, ergaben keine eindeutigen Verbesserungen [zusammengefaßt in 41].

Zur Verminderung der toxischen Effekte von IL-1 ist neben dem Einsatz des Rezeptorantagonisten auch eine Verwendung löslicher Rezeptoren oder neutralisierender Antikörper gegen IL-1 oder die Rezeptoren möglich [z. B. 9, 39, 47]. Da aber die förderlichen, für die Abwehrreaktionen des Wirtsorganismus notwendigen Mechanismen und die toxischen Wirkungen von IL-1 nahe beieinander liegen, ist ein Eingreifen in dieses sehr empfindliche Regelsystem schwierig.

Ein weiterer denkbarer Angriffspunkt für eine pharmakologische Intervention ist die durch IL-1 ausgelöste Signaltransduktionskette in der Zelle. Dieses Eingreifen erfordert eine sehr genaue

Kenntnis des Systems; es hätte jedoch den Vorteil, daß der Eingriff spezifischer und evtl. auf bestimmte Zelltypen begrenzt stattfinden könnte.

1.3 Die intrazellulären Effekte von Interleukin-1

Einige Autoren beschreiben ein durch IL-1 bedingtes Ansteigen der intrazellulären cAMP-Konzentration [178, 121]. Durch einen spezifischen Inhibitor von cAMP-abhängigen Proteinkinasen kann die IL-1-induzierte Genexpression blockiert werden, daher wird von Chedid & Mizel [22] angenommen, daß cAMP-abhängige Proteinkinasen an der IL-1-Signalweiterleitung beteiligt sind. Als weiterer möglicher intrazellulärer Botenstoff im IL-1-Signaltransfer ist Diacylglycerol (DAG) nachgewiesen worden [142]. Andere Autoren konnten jedoch keinen Anstieg von cAMP oder DAG in mit IL-1 stimulierten Zellen feststellen [zusammengefaßt in 129]. Ein Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} ist bisher nicht beschrieben worden.

O'Neill et al. vermuten eine Kopplung des IL-1-Rezeptors mit einem Guanosinnukleotid-bindenden Protein (G-Protein), da sie in Membranfraktionen von stimulierten Zellen eine GTPase-Aktivität messen konnten [128]. Die Identifizierung einer GAP-artigen Domäne (*GTPase activating protein*) in dem rezeptorassoziierten Protein IIP1 (*IL-1 receptor interacting protein*) gibt einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung von G-Proteinen am IL-1-Signaltransfer [154].

Als ein Botenstoff der Lipidklasse im IL-1-Signalweg wurden Prostaglandine in stimulierten Synovialzellen nachgewiesen [116]. Der durch IL-1 verursachte Anstieg von Prostaglandin E_2 (PGE_2) ist auf eine Induktion der Cyclooxygenase zurückzuführen [127, 141]. Auch eine durch die Aktivierung einer Phospholipase A2 verursachte Arachidonsäure-Freisetzung wurde mehrfach beschrieben [25, 68]. Mathias et al. vermuten die Auslösung des Sphingomyelin-Signalweges durch IL-1, da das Zytokin zur Abnahme von Sphingomyelin und zum Anstieg von Ceramid in einer T-Zelllinie führte [108].

Die Stimulierung von Zellen mit IL-1 führt zur Aktivierung verschiedener Kinasen und Phosphatasen. Muñoz et al. stellten die Aktivierung einer Tyr-spezifischen Kinase fest, die mehrere endogene Substrate phosphoryliert [122]. Bird et al. beschreiben die schnelle Aktivierung einer Ser/Thr-spezifischen Kinaseaktivität, die auf zwei ERK/MAP2-Kinasen zurückzuführen ist, wie immunologisch belegt wurde [11]. Saklatvala et al. zeigten, daß der Aktivator der MAP-Kinase, die MAP-Kinase-Kinase, ebenfalls durch IL-1 zu aktivieren ist [145]. Eine durch IL-1 auslösbare Proteinkinase-Kaskade führt zur Phosphorylierung von Hsp27. Mehrere Kinasen dieser Kette wurden charakterisiert, wobei sich herausstellte, daß zumindest die Kinase, die Hsp27 phosphoryliert, keine MAP-Kinase ist [70, 54]. Im Gegensatz zu den Autoren, die die zytokinabhängige Phosphorylierung von Hsp27 in den Zusammenhang mit der Signaltransduktion stellen, vermutet Arrigo, daß es sich bei der Phosphorylierung von kleinen Hitzeschock-Proteinen um eine zelluläre Antwort auf die cytotoxischen Wirkungen handelt, die von dem Zytokin vermittelt werden [6].

Eine weitere, durch IL-1 zu stimulierende Ser/Thr-spezifische Kinase ist die rezeptorassoziierte Kinase IRAK (*IL-1 receptor associated kinase*) [105, 19], auf die noch näher eingegangen werden wird. Neben der Aktivierung von Kinasen wurde auch die Inaktivierung einer SH-

abhängigen Protein-Phosphatase durch IL-1 beobachtet [71].

Die Bindung von Peptidhormonen an Oberflächenrezeptoren führt zur Expression spezifischer Gene in den entsprechenden Zielzellen. Dies geschieht mit Hilfe von nukleären Transkriptionsfaktoren, die über eine Abfolge von enzymatischen Schritten aktiviert werden. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB durch IL-1 wurde von Osborn et al. gezeigt [130]. Über diesen Transkriptionsfaktor wird z. B. die Expression von IL-6 [179, 151], von IL-2 [78] sowie die Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen [118, 27] gesteuert. Ein weiterer, durch IL-1 regulierter Transkriptionsfaktor ist AP-1 (*activator protein-1*). Aktives AP-1 ist ein Dimer, welches aus den Produkten der jun- und fos-Genfamilie zusammengesetzt ist. IL-1 stimuliert die Expression von c-jun und ermöglicht so die Bildung des Transkriptionsfaktors AP-1, der die Expression von IL-2 reguliert [119]. Auch die Expression der zweiten Komponente des Transkriptionskomplexes, c-fos, wird durch IL-1 stimuliert [120].

Nach Arrigo [6] wirkt die oben erwähnte, durch proinflammatorische Zytokine verursachte Phosphorylierung von Hsp27 auf den Schutz der Zelle vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), deren Level durch die Zytokine erhöht wird. Diese schützende Wirkung ist von Glutathion abhängig, welches zur Reduktionskraft der Zelle beiträgt [112]. Möglicherweise hat das phosphorylierte Hsp27 eine positiv regulierende Wirkung auf die Enzyme des redoxabhängigen Glutathionweges, wie z. B. die Glutathionreduktase oder die Glutathionperoxidasen, und erhöht damit die Reduktionskraft der Zellen. Hierdurch wird der Gehalt von intrazellulären ROS gesenkt und damit der IL-1-Effekt, wie z. B. die NFκB-Aktivierung, vermindert. Ob die kleinen Hitzeschock-Proteine hierbei eine Chaperon-Funktion gegenüber den Enzymen des redoxabhängigen Glutathionweges ausüben, ist bisher noch unklar [6]. Auch von Tewes et al. wird vermutet, daß der IL-1-Signaltransfer durch Redox-Regulation beeinflusst wird, da die Aktivierung der rezeptorassoziierten Kinase IRAK durch Thiol-modifizierende Agentien gehemmt wird; eine entsprechende Hemmung wurde ebenfalls bei der NFκB-Aktivierung beobachtet [159]. Die durch IL-1 zu aktivierenden Kinasen ERK2 (*extracellular signal-regulated protein kinase 2*) und JNK (*Jun-NH₂-terminal kinase*) [172] sowie die durch IL-1 zu deaktivierende Phosphatase [71] erwiesen sich ebenfalls als redox-sensitiv. Möglicherweise sind Fettsäure-Hydroperoxide Mediatoren des IL-1-Signalweges, denn eine Überexpression der Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase (PHGPx), deren bevorzugtes Substrat Fettsäure-Hydroperoxide sind, inhibiert die NFκB-Aktivierung durch IL-1 [15].

1.4 Die IL-1-Rezeptoren

Die Rezeptoren für IL-1 treten auf den meisten Zellen in nur sehr geringer Anzahl auf (200-300 Rezeptoren pro Zelle). Einige Zelltypen, wie z. B. T-Lymphozyten, weisen allerdings wesentlich mehr Rezeptoren auf; die murine Thymoma-Zelllinie EL4-6.1 besitzt etwa 20 000 Rezeptoren auf jeder Zelle [102]. 1988 gelang es Sims et al., den ersten IL-1-Rezeptor (IL-1RI) durch eine cDNA-Expressions-Klonierung zu sequenzieren [152]. Drei Jahre später wurde ein weiterer IL-1-Rezeptor (IL-1RII) von McMahan et al. kloniert [111]. Beide Proteine gehören zur Immunglobulin-Superfamilie und besitzen im extrazellulären Bereich drei immunglobulinartige Domänen. In diesem Segment besteht eine Identität auf Aminosäureebene von 28% zwischen

den Rezeptortypen [43]. Auch die Transmembran-Domäne beider Proteine ist sehr ähnlich. Im cytoplasmatischen Teil der Rezeptoren zeigen sich drastische Unterschiede, denn IL-1RI erstreckt sich mit 215 Aminosäuren in das Cytoplasma der Zelle, wohingegen IL-1RII hier nur 29 Aminosäuren besitzt. Dieser Unterschied im intrazellulären Teil der Rezeptoren bedingt die Größenunterschiede beider Moleküle: IL-1RI hat ein Molekulargewicht von 80 kD, IL-1RII von 68 kD. Beide Rezeptoren enthalten im extrazellulären Teil mehrere Glykosylierungsstellen, so daß das eigentliche Molekulargewicht größer ist [24]. IL-1RI ist auf allen Zellen zu finden, wohingegen IL-1RII vorwiegend auf Neutrophilen, Monozyten und B-Lymphozyten lokalisiert ist [40].

Die verkürzte cytoplasmatische Domäne von IL-1RII legt nahe, daß sich die IL-1-Rezeptoren in der Signalweiterleitung voneinander unterscheiden. So konnte von Colotta et al. [29] und Sims et al. [153] gezeigt werden, daß die Signalweiterleitung ausschließlich über IL-1RI stattfindet. Colotta et al. [29] vermuten, daß IL-1RII durch Bindung von IL-1 inhibierend auf die IL-1-Aktivität wirkt und damit eine regulatorische Funktion übernimmt (*decoy target*). Von IL-1RII tritt eine lösliche Form auf, die in der Lage ist, IL-1 zu binden. Im Organismus kann auch diese Form dazu dienen, den IL-1-Effekt zu reduzieren [40]. Damit besitzt das IL-1-System zwei antagonistische Elemente: (i) den Rezeptor IL-1RII und (ii) den natürlich vorkommenden Rezeptorantagonisten IL-1ra.

Beide Rezeptortypen binden sowohl IL-1 α als auch IL-1 β . IL-1 α hat allerdings eine höhere Affinität zu IL-1RI, IL-1 β hingegen zu IL-1RII [149]. Der Rezeptorantagonist IL-1ra bindet bevorzugt den signalweiterleitenden Rezeptor IL-1RI. Gallis et al. zeigten, daß IL-1RI nach Ligandenbindung sehr schnell an den Aminosäuren Serin und Threonin phosphoryliert wird. Für die Phosphorylierung aller IL-1RI einer Zelle ist es ausreichend, wenn nur 5% der Rezeptoren mit einem Liganden besetzt sind [55].

Mizel et al. stellten fest, daß 50% des oberflächengebundenen IL-1 nach 60-120 min internalisiert wird. Bis zu sechs Stunden nach der Internalisierung ist IL-1 noch nicht abgebaut [117]. Curtis et al. beschreiben die Internalisierung des intakten IL-1/IL-1RI-Komplexes und seine Akkumulation im Kern der Zelle [34]. Diese Internalisierung ist eine Voraussetzung für die biologische Wirkung des Zytokins [164]. IL-1RII wird kaum internalisiert [76]. Der IL-1 α /IL-1RI-Komplex, jedoch nicht IL-1 α allein, bindet an immobilisierte DNA und eluiert bei der gleichen Ionenstärke wie der Östrogenrezeptor [170].

Die IL-1-Rezeptoren weisen keine Homologien mit anderen Zytokinrezeptorfamilien auf. Es wurden jedoch einige Moleküle charakterisiert, die Ähnlichkeiten mit den IL-1-Rezeptoren zeigen. Eines dieser, der IL-1-Rezeptorfamilie zugehörigen Proteine ist der T1/ST2-Rezeptor. Dieses Protein ähnelt dem IL-1RI in der cytoplasmatischen und in der extrazellulären Domäne (28% Identität auf Aminosäureebene über das gesamte Molekül) [160, 175]. Es konnte aber nicht gezeigt werden, daß T1/ST2 eines der IL-1-Familienmitglieder bindet [57]. Chimäre Proteine aus der extrazellulären Domäne von IL-1RI und der intrazellulären Domäne von T1/ST2 waren im IL-1-Signaltransfer aktiv, so daß zwischen den beiden Proteinen eine funktionelle Verwandtschaft vorhanden sein muß [115]. Parnet et al. [133] klonierten ein weiteres Protein, welches Ähnlichkeiten mit dem IL-1-Rezeptor aufweist (27% Aminosäure-Identität). Es wurde IL-1Rrp (*receptor related protein*) benannt und bindet wie T1/ST1 keinen der bekannten IL-1-Liganden. Doch auch in diesem Fall war ein chimäres Protein aus der extrazellulären Domäne von IL-1RI und der intrazellulären Domäne von IL-1Rrp im Signaltransfer aktiv.

Der cytoplasmatische Teil des IL-1RI weist Ähnlichkeiten mit dem Rezeptormolekül Toll aus *Drosophila melanogaster* auf (45% Aminosäure-Identität bzw. konservativ substituierte Aminosäuren) [56]. Zwischen dem extrazellulären Teil von Toll incl. dem Liganden Spaetzle und dem entsprechenden Teil des IL-1-Rezeptors plus IL-1 besteht hingegen keine Ähnlichkeit. Toll aktiviert über das Kopplungsprotein Tube die Ser/Thr-spezifische Kinase Pelle, die Ähnlichkeiten mit der IL-1-rezeptorassoziierten Kinase IRAK zeigt. Die Kinase Pelle in *D. melanogaster* löst eine Phosphorylierungskaskade aus, die schließlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Dorsal, einem Homolog von NFκB, führt [69, 19]. Das System um den Rezeptor Toll in *D. melanogaster* weist also sehr augenfällige Parallelen zur IL-1-Signaltransduktion auf.

1.5 Der Signaltransduktions-Komplex

Viele Zytokin- oder Wachstumsfaktor-Rezeptoren besitzen eine intrinsische Tyr-spezifische Kinase oder Anlagerungsstellen für solche Kinasen. Oft kommt es zur Dimerisierung von Rezeptoruntereinheiten und zur Aktivierung der Kinase, die durch Transphosphorylierung sich selber und die Rezeptoruntereinheiten phosphoryliert [zusammengefaßt in 73]. Die IL-1-Rezeptoren besitzen keine intrinsische Kinaseaktivität. Auch die Assoziation einer Tyr-spezifischen Kinaseaktivität wurde bisher nicht beobachtet. Es wirken jedoch eine Vielzahl von Faktoren an der Bildung eines funktionellen IL-1-Bindungs- und Signaltransfer-Komplexes mit. Ein Molekül, das neben dem IL-1-Rezeptor am IL-1-Signaltransfer beteiligt ist, ist das von Greenfeder et al. klonierte, rezeptorassoziierte Protein IL-1RAcP (*receptor accessory protein*). IL-1RI formt ein Heterodimer mit IL-1RAcP und wird daher von den Autoren als eine zweite Untereinheit des IL-1-Rezeptors beschrieben. IL-1RAcP selbst ist nicht in der Lage, IL-1 zu binden [67]. Ob IL-1RAcP konstitutiv an den IL-1-Rezeptor gebunden ist, oder ob dieses Protein erst nach Ligandenbindung von IL-1RI durch laterale Diffusion mit IL-1RI assoziiert, ist bisher noch nicht geklärt. Der Nachweis, daß IL-1RAcP für den IL-1-Signaltransfer notwendig ist, wurde von Korherr et al. [84] und Wesche et al. [171] erbracht: Sie zeigten, daß eine bezüglich IL-1 nicht-sensitive Zelllinie durch Transfektion mit der cDNA für IL-1RAcP in die Lage versetzt wird, auf IL-1 zu reagieren. Unter anderem wurde in den Zellen durch die Transfektion mit IL-1RAcP die Fähigkeit hergestellt, den IL-1/IL-1RI-Komplex zu internalisieren [84].

Sequenzähnlichkeiten der cytoplasmatischen Domäne von IL-1RAcP mit dem Protein MyD88 lassen eine Beteiligung von MyD88 am IL-1-Signaltransfer vermuten. Expressionsstudien des intakten sowie des trunkierten Proteins bestätigten, daß MyD88 als ein Adaptor- oder Regulatorprotein bei der IL-1-abhängigen NFκB-Aktivierung mitwirkt [123].

1994 beschrieben Martin et al. eine Ser/Thr-spezifische Kinaseaktivität, die mit dem aktivierten IL-1-Rezeptor (Typ I) copräzipitiert werden kann. Dieses Enzym phosphoryliert ein copräzipitierbares endogenes Substrat von 60 kD, dessen molekulare Natur bislang noch nicht identifiziert werden konnte [105]. Durch Mutagenesestudien des IL-1-Rezeptors wurde von Croston et al. eine Region der cytoplasmatischen Domäne von IL-1RI identifiziert, die sowohl für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB als auch für die Assoziation dieser Kinase an IL-1RI entscheidend ist [32].

Die Aktivierung von IRAK erfolgt innerhalb von 30 sec, und nach der Assoziation an IL-1RI

findet eine Phosphorylierung der Kinase statt [19]. Ob es sich hierbei um eine Autophosphorylierung oder um die Phosphorylierung durch eine weitere aktivierte Kinase handelt, konnte bislang noch nicht geklärt werden. Die Sequenzierung von IRAK offenbarte die auffällige Ähnlichkeit mit der Ser/Thr-spezifischen Kinase Pelle aus *Drosophila melanogaster* [19].

Eine Datenbanksuche nach Proteinen, die Sequenzähnlichkeiten mit IRAK aufweisen, führte zur Identifizierung eines als IRAK-2 bezeichneten Proteins. Expressionsstudien zeigten eine Beteiligung von IRAK-2 an der IL-1-abhängigen NFκB-Aktivierung. Es konnte jedoch keine Komplexbildung zwischen IRAK-2, dem Adaptormolekül MyD88 und den IL-1-Rezeptoren nachgewiesen werden [123].

1996 wurde von Cao et al. [20] beschrieben, daß ein neues Mitglied der TRAF-Proteinfamilie, TRAF6, als Signalüberträger am IL-1-Signalprozeß beteiligt ist. Nach IL-1-Stimulierung findet eine Assoziation von IRAK und TRAF6 statt. Eine Überexpression von TRAF6 führt zur permanenten Aktivierung von NFκB, so daß die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors als der Zielpunkt des IRAK/TRAF6-Weges angenommen werden kann.

Ein weiteres mit dem IL-1-Rezeptor interagierendes Protein ist IIP1 (*IL-1 receptor interacting protein*). Im unstimulierten Zustand der Zellen kann dieses Protein mit dem IL-1-Rezeptor copräzipitiert werden. Nach Ligandenbindung dissoziiert es vom Rezeptor. Eine Überexpression führt zur Reduktion des IL-1-Signals, so daß anzunehmen ist, daß IIP1 eine negativ regulierende Funktion inne hat [114]. Die Klonierung von IIP1 zeigte, daß das Protein eine GAP-artige Domäne (*GTPase activating protein*) besitzt [154]. Diese Tatsache läßt Rückschlüsse auf die Beteiligung von G-Proteinen im IL-1-Signaltransfer zu. Einen weiteren wichtigen Hinweis auf die Mitwirkung von G-Proteinen vom Ras-Typ im IL-1-Signalweg gibt die von Matthews & O'Neill veröffentlichte Arbeit [110]: Die Autoren stellen dar, daß dominant/negative Mutanten von kleinen G-Proteinen die IL-1-Effekte vermindern. Bei G-Proteinen handelt es sich um membranassoziierte Proteine, die aktivierte Hormonrezeptoren mit enzymatischen Effektoren koppeln. Man unterscheidet zwei Gruppen innerhalb dieser Proteinklasse: (i) heterotrimere G-Proteine mit α-, β- und γ-Untereinheit und (ii) die GTP-bindenden Proteine niedrigen Molekulargewichts (um 20 kD), die nach einem Vertreter dieser Gruppe als ras-artige Proteine bezeichnet werden. Es handelt sich um "molekulare Schalter" mit intrinsischer GTPase-Aktivität, die durch die Natur des gebundenen Nukleotids in ihrer Aktivität reguliert werden [zusammengefaßt in 16]. Die GTPase-aktivierende Funktion des am nicht-aktivierten IL-1-Rezeptor assoziierten IIP1 ermöglicht evtl. die Hydrolyse des an einem hypothetischen G-Protein gebundenen GTP und versetzt das G-Protein damit von einem aktiven in einen inaktiven Zustand, der durch die Bindung von GDP charakterisiert ist. Die Aktivierung des IL-1-Rezeptors durch Bindung von IL-1, gefolgt von der Assoziation von IL-1RAcP und Aktivierung von IRAK könnte die Aktivierung eines hypothetischen Proteins mit Guanosinnukleotid-Austauschfunktion verursachen, so daß das GDP des inaktiven G-Proteins von einem GTP verdrängt und das G-Protein damit aktiviert wird. Dieser aktivierte Zustand wird beibehalten, da IIP1 (mit der GTPase-aktivierenden Aktivität) von IL-1RI nach Stimulierung dissoziiert. Das aktive G-Protein könnte auf weitere Enzymsysteme in der Zelle, wie z. B. die MAP-Kinasekaskade, wirken [106]. Die Beteiligung von IRAK am Prozeß der G-Protein-Aktivierung ist nicht belegt, und es ist denkbar, daß es sich bei den Vorgängen um das hypothetische G-Protein und bei dem Geschehen um IRAK, TRAF6 und NFκB um parallele Abläufe handelt (siehe Abb. 1).

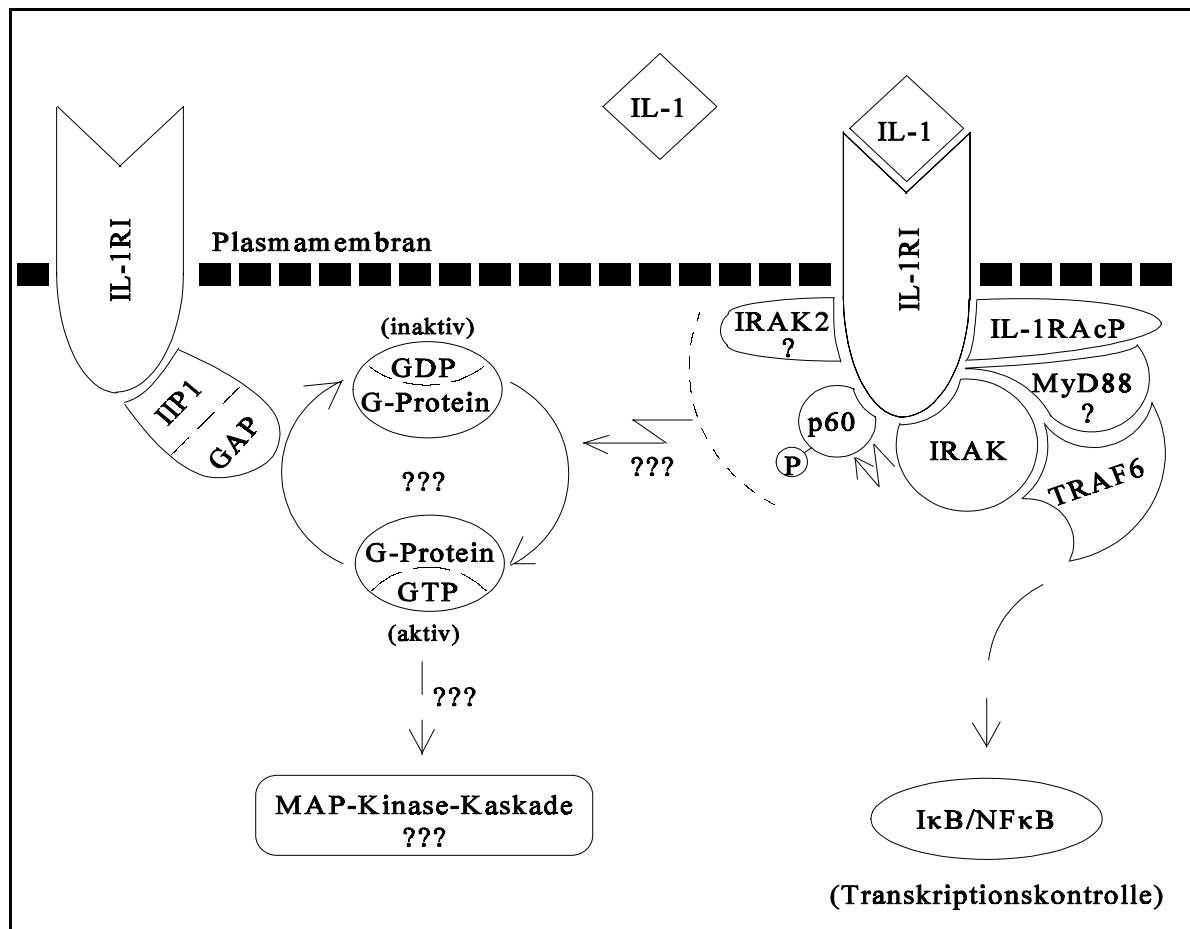


Abbildung 1: Hypothetisches Modell zum Geschehen am IL-1-Rezeptor (Erklärung im Text).

Die sehr unterschiedlichen IL-1-Effekte, die beschrieben sind, sind zum großen Teil wahrscheinlich auf zellspezifische Gegebenheiten zurückzuführen. Es ist jedoch anzunehmen, daß die frühen Ereignisse, die direkt mit dem IL-1-Rezeptor zu tun haben, eine gewisse Übereinstimmung in den verschiedenen Systemen aufweisen (siehe auch Abb. 1). Ein genaues Verständnis dieser Vorgänge am IL-1-Rezeptor ist die Voraussetzung für ein gezieltes pharmakologisches Eingreifen in das IL-1/IL-1RI-System, wie es für die Therapie von vielen entzündlichen Erkrankungen wünschenswert ist.

Um zum allgemeinen Verständnis des Geschehens am IL-1-Rezeptor beizutragen, sollte im Rahmen dieser Arbeit zum einen die rezeptorassoziierte Kinase IRAK charakterisiert werden und zum anderen die Identifizierung weiterer Komponenten des IL-1-Rezeptorkomplexes durchgeführt werden. Als methodischer Ansatzpunkt bot sich hierfür eine Immunopräzipitation des IL-1-Rezeptors an, denn Lewis et al. konnten zeigen, daß der IL-1-Rezeptor als ein Komplex in der Zellmembran existiert, der sich durch eine Immunopräzipitation mit einem Antikörper gegen den Rezeptor isolieren läßt [97]. Martin et al. bestätigten, daß mit dieser Methode ein funktioneller Rezeptorkomplex zu isolieren ist, da die durch IL-1 zu stimulierende Kinase IRAK in dem Immunopräzipitat nachweisbar ist [105].

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Amersham Buchler	[¹⁴ C]methylierte Standardproteine, ³⁵ S- α -dATP
Amersham USB	alkalische Phosphatase
Amicon	Centricon-Konzentratoren
Baker	Lösungsmittel
BioLabs	RNA-Marker, Restriktionsenzyme
BioRad	Elektroporationsküvetten
Boehringer Mannheim	Histon-1, Nylon-Membran, DIG-System, DNA-Marker
Costar	Zellkulturplatten, Kryoröhrchen
DAKO	Antikörper 6.5B5
DIANOVA	Antikörper Anti-Maus-Cy3
DIFCO	Agar, Hefeextrakt, Trypton
DuPont NEN	³² P- γ -ATP, ³³ P- γ -ATP, ¹⁴ C-FSBA, EN ³ HANCE
Eppendorf	Plastikmaterial
Falcon	Zellkultur-Plastikmaterial
Filtron	Filtrationseinheiten
Fluka	DMF, FSBA, DMSO
GENOMED	Gel-Extraktions-Kit
GIBCO	RPMI1640, Penicillin/Streptomycin, Glutamax, G418, Trypsin, Lipofectamin, OPTI-MEM, Oligonukleotide, Formamid
Greiner	Reaktionsgefäße, Zellkulturmaterialien
Invitrogen	<i>E. coli</i> INV α F', TA-Klonierungs-Kit, pcDNA3
Kodak	Biomax MR, X-omat (Filme)
MBI Fermentas	Restriktionsenzyme
Merck	Formaldehyd
Millipore	PVDF-Membran, Filtrationseinheiten
Molecular Research Center, Inc.	Tri-Reagenz
NOVEX	Fertiggele
Perkin Elmer Cetus	GeneAmp RNA PCR-Kit, Zyklus-Sequenzier-Kit
Pharmacia	LMW-Größenstandards, Materialien für das PhastSystem, Repel-Silane, Bind-Silane, Coomassieblau-Tabletten, ³² P-Sequenzierungs-Kit, Macrophor Sequenzier-System
Pharmingen	Antikörper 12A6 und 6B5
Pierce	BCA-Proteinreagenz, Phosphocellulose-Einheiten
Promega	AP-Substratlösung, Restriktionsenzyme
QIAGEN	Plasmid-Reinigungs-Kit
Riedel-de Haën	Salzsäure, Natronlauge, NaCl
Roth	Bis/Acrylamid-Lösungen, Plastikmaterialien, Phenol

Sartorius	Sterilfilter-Spritzenaufsätze
Seromed	M199, L-Glutamin
Serva	SDS, APS, TEMED, Agarose
Sigma	FCS, Trypanblau-Lösung, Ponceau S-Konzentrat, Antikörper, Protein G-Sepharose, alle übrigen Laborchemikalien
Stratagene	<i>E. coli</i> XL-1Blue MRA
StressGen	Antikörper SPA-810
Whatman	Filterpapier
Zinsser Analytic	Szintillationsflüssigkeit

2.2 Geräte

Applied Biosystems	DNA-Sequenziergerät, Protein-Sequenziergeräte
Berthold	Flüssigkeitsszintillationszähler BF Betaszint 5000
Biometra	Gelelektrophoresegerät für Proteine
BioRad	Gene Pulser II, Capacitance Extender Plus, Pulse Controller Plus (Elektroporationsgeräte)
Biotech International	Schüttelinkubator
Duran	Glasgeräte
Eppendorf	Tischzentrifuge, Thermomixer, Pipetten, Pipettierhilfen
Gesellsch. f. Labortechnik GmbH	Wasserbad
GIBCO	Elektrophoresegerät für Nukleinsäuren
Heidolph	Laborschüttler (Vortex), Magnetrührer
Heraeus	Sterilwerkbank, Trockenschrank, Brutschrank, Megafuge, Biofuge fresco
Herolab	Video Scan-System
INTAS	Filmentwickler Protec M45
Labotect	Brutschrank
Millipore	Millipore-Q-Filtrationsanlage
Nalgen	Freezing Container
Neubauer	Zellzählkammer
Nikon	Mikroskop
NOVEX	Gelelektrophoresegerät für Proteine
Perkin Elmer Cetus	PCR-Gerät
Perseptive	Fluoreszenzspektrometer
Pharmacia	Horizontal-Elektrophoreseanlage (PhastSystem), GeneQuant (Photometer), UV/VIS-Spektrophotometer
Sartorius	Analysenwaage, Laborwaage, pH-Meter
Sauter	Autoklav
Schott	Glasgeräte
Sorvall	Zentrifuge RC5C

2.3 Arbeiten mit eukaryontischen Zellen

2.3.1 Zelllinien

EL4-6.1:	Zelllinie aus einem T-Lymphom der Maus
Jurkat E6.1:	Zelllinie aus einem humanen T-Lymphom
Würzburg:	Sublinie von Jurkat E6.1
ECV-304:	Zelllinie aus einer humanen Nabelschnur-Endothelzelle
HepG2:	Zelllinie aus einem humanen Lebercarcinom

Die Zelllinie EL4-6.1 wurde freundlicherweise von M. Martin (MH Hannover), die anderen Zelllinien wurden von R. Brigelius-Flohé (DIfE Potsdam-Rehbrücke) zur Verfügung gestellt.

2.3.2 Sterilisieren

Die Glasflaschen für die Zellkultur werden einmal mit Wasser gefüllt und einmal trocken autoklaviert (120°C, 20 min, 2,1 bar). Glaspipetten und andere Glasgeräte werden 2 h bei 180°C in einem Trockenschrank sterilisiert. Plastikmaterialien werden autoklaviert (120°C, 20 min, 2,1 bar). Lösungen thermolabiler Stoffe werden durch Filter mit einer Porengröße von 0,22 µm sterilfiltriert.

2.3.3 Kulturmedien und Lösungen

Das zur Herstellung der verschiedenen Medien und Lösungen verwendete Wasser wird in einer Milli-Q-Filtrationsanlage (Millipore) aus deionisiertem Wasser aufbereitet und autoklaviert.

Medien für EL4-6.1:	1. RPMI1640 2 mM Glutamax 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 5% FCS
	2. ZKT-1 (Zusammensetzung GBF-spezifisch) 2,5% FCS

Medium für Jurkat E6.1, Würzburg, HepG2:	RPMI1640 2 mM Glutamax 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 5% FCS
--	--

Medium für ECV-304:	M199 30 mM NaHCO ₃ 5 mM HEPES 0,68 mM L-Glutamin 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin 5% FCS
Fötales Kälberserum (FCS):	Das FCS wird 30 min im Wasserbad bei 56°C erhitzt und in Aliquots bei -20°C gelagert.
Penicillin/Streptomycin:	Penicillin und Streptomycin werden als 100-fache Stammlösung bezogen und in gebrauchsfertigen Aliquots bei -20°C aufbewahrt.
L-Glutamin:	L-Glutamin wird als 300-fache Lösung (200 mM) bezogen und in Aliquots eingefroren.
Glutamax:	Glutamax (L-Alanin-L-Glutamin) wird als 100-fache Stammlösung in gebrauchsfertigen Aliquots bei -20°C gelagert.
Geneticin:	Geneticin (G418 Sulphat) wird in 100 mM HEPES, pH 7,3 gelöst (400 mg/ml), sterilfiltriert und in Aliquots bei -20°C eingefroren.
Trypsin-Lösung:	Lyophilisiertes 10x Trypsin-EDTA (5 g Trypsin (1:250), 2 g EDTA, 8,5 g NaCl/l) wird in 20 ml sterilem Wasser aufgenommen und mit PBS auf 200 ml aufgefüllt. Nach Sterilfiltration (0,22 µm) wird die Lösung in Aliquots bei -20°C aufbewahrt.
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>):	10 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,4 138 mM NaCl 3 mM KCl PBS wird als 10-fache Stammlösung angesetzt, autoklaviert und bei RT gelagert.

2.3.4 Kultivierung von Zellen

Suspensionszellen (EL4-6.1, Jurkat E6.1, Würzburg) werden mit $0,5-1 \times 10^5$ Zellen/ml angesät und bei 37°C und 5% CO_2 (für das Medium ZKT1 10% CO_2) in Zellkulturflaschen (T_{25} , T_{83} , T_{175}) oder Gewebekulturschalen (Durchmesser 8,3 cm) kultiviert. Nach Erreichen einer Zelldichte von $1,5-2 \times 10^6$ Zellen/ml werden die Zellen mit frischem Medium wieder auf $0,5-1 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt.

Adhärenent wachsende Zellen (ECV-304, HepG2) werden mit Trypsin-EDTA von ihrem Substrat abgelöst. Bevor die Zellen mit der Trypsin-Lösung benetzt werden, werden sämtliche Reste des Wachstumsmediums mit PBS gewegewaschen. Für eine T_{25} -Flasche wird 1 ml Trypsin-Lösung, für T_{83} und Gewebekulturschalen (8,3 cm Durchmesser) 2 ml und für T_{175} 4 ml Trypsin-Lösung eingesetzt. Die mit Trypsin-Lösung versehenen Zellen werden 2 min im Brutschrank (37°C , 5% CO_2) inkubiert. Das Ablösen der Zellen wird mikroskopisch kontrolliert und gegebenenfalls durch Klopfen beschleunigt. Nach dem Stoppen der Reaktion durch Zugabe von serumhaltigem Medium werden die Zellen 7 min bei $200 \times g$ abzentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen. Für die Erhaltung wird 1:5 oder 1:10 gesplittet und bis zur Konfluenz kultiviert. Alle 3-4 Tage wird das Medium erneuert.

Folgende Medienvolumina werden für die verschiedenen Gefäßgrößen eingesetzt:

T_{25} (25 cm ² Kulturfläche):	10 ml
T_{83} (83 cm ² Kulturfläche):	20-30 ml
T_{175} (175 cm ² Kulturfläche):	50-80 ml
Gewebekulturschale (8,3 cm Durchmesser):	10-15 ml

2.3.5 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wird nach einer Lebendfärbung mit einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung (Sigma) in einer Zellzählkammer (Neubauer) bestimmt. Die Auszählung erfolgt in zwei Großquadraten mit je 16 Quadraten (Tiefe 0,1 mm, Seitenlänge 0,25 mm). Die Zelldichte wird nach folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{gezählte Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10\,000}{\text{Anzahl ausgezählter Großquadrate}} = \text{Zellen/ml}$$

2.3.6 Kryokonservierung von Zellen

2.3.6.1 Einfrieren von Zellen

Einfriermedium: 70% Medium (RPMI 1640 oder M199)
 20% FCS
 10% DMSO (Dimethylsulfoxid)

Zellen in exponentieller Wachstumsphase (gegebenenfalls trypsiniert) werden bei 200 x g für 7 min abzentrifugiert, der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet in gekühltem Einfriermedium aufgenommen. Die Zellen werden bei einer Zelldichte von $5\text{-}10 \times 10^6$ Zellen/ml in Aliquots zu 1 ml langsam auf -80°C gekühlt (*Freezing container*, Nalgene). Die längerfristige Lagerung erfolgt bei -196°C über flüssigem Stickstoff.

2.3.6.2 Auftauen von Zellen

Die gefrorene Kryokultur wird bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach der langsamen Zugabe von 30 ml vorgewärmtem Wachstumsmedium werden die Zellen mit 200 x g (5 min) abzentrifugiert, in insgesamt 30 ml frischem Medium aufgenommen und bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

2.3.7 Fermentation

Um größere Zellmengen für Immunopräzipitationen und Kinasemessungen zu erhalten, wird die Zelllinie EL4-6.1 in einem Rührreaktor kultiviert. Hierfür wird ein Reaktorsystem mit blasenfreier Begasung und Perfusionsbetrieb verwendet [95, 12]. Als Reaktorgefäß dient ein 2,5 l Doppelmantelglasgefäß (Karlsruher Glastechnisches Werk, Karlsruhe), welches mit einem von Membranschläuchen umwickelten Rührkörper, einer Sauerstoffelektrode (Ingold, Urdorf, Schweiz) und einem Probenentnahmerohr bestückt ist. Die Peripherie der Anlage bilden ein Temperierbad (Kompaktthermostat MS3, Meßgeräte-Werk Lauda, Lauda-Königshofen), eine Inokulumflasche, eine Abgasflasche und eine Begasungseinheit aus pO_2 -Regler (Ingold, Urdorf, Schweiz) und Gasmischstation (GBF-Eigenbau). Für den Perfusionsbetrieb werden zusätzlich eine Medienvorratsflasche, zwei Peristaltikpumpen (Watson-Marlow 501 U/R, Petro Gas, Berlin) und eine Füllstandsregelung, bestehend aus einer Füllstandssonde und einem Leitfähigkeitsgrenzwertschalter (Vegator 4331, Vega, Schiltach), installiert. Als Medium für die Fermentation wird ZKT1 mit 2,5% FCS eingesetzt. 300 ml Kultur (fünf T_{175} -Flaschen) mit einer Zelldichte von $1,5\text{-}2 \times 10^6$ Zellen/ml werden zum Animpfen des Reaktors benötigt, so daß die anfängliche Zelldichte etwa 2×10^5 Zellen/ml beträgt. Die CO_2 -Begasung zur Pufferung des Mediums wird auf 8,5% eingestellt, die Sauerstoffzufuhr wird in Abhängigkeit vom Verbrauch der wachsenden Kultur automatisch geregelt. Bei der täglichen Probennahme wird die Lebendzellzahl mit einer Trypanblau-Färbung (siehe 2.3.5) ermittelt und der pH-, der Glucose-

und der Lactatwert im Kulturüberstand bestimmt. Für die Messung des Glucose- und Lactatgehaltes wird ein Glucose/Laktat-Analysator (Firma Yellow Springs Instruments, Modell 2000, Yellow Springs, Ohio, USA) verwendet. Ab einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml wird die Mediumperfusion auf 1 Reaktorvolumen pro Tag eingestellt. Unter diesen Kulturbedingungen werden Zelldichten von bis zu $2,5 \times 10^7$ Zellen/ml erreicht. Für die Ernte wird ein großer Teil der Kultur (2000-2400 ml) abgenommen und der Reaktor mit frischem Medium aufgefüllt. Die Fermentationen werden mit freundlicher Unterstützung der Abteilung "Zellkulturtechnik" der GBF durchgeführt.

2.3.8 Stimulierung der Zellen

Die Zellen werden mit IL-1 β stimuliert, welches freundlicherweise von P. Paulsen (GBF) zur Verfügung gestellt wurde. Hierbei handelt es sich um rekombinantes Material, welches durch die Expression des Gens für das reife, humane IL-1 β in *Escherichia coli* gewonnen wurde. Die Lagerung des aufgereinigten Zytokins erfolgt in Aliquots bei -20°C in einer Konzentration von 100-400 μ g IL-1 β /ml PBS. Direkt vor Gebrauch wird aus dieser Lösung eine Arbeitslösung mit 1 μ g IL-1 β /ml Medium hergestellt.

Die Stimulierung der Zellen mit Interleukin-1 zur Aktivierung der am IL-1-Rezeptor assoziierten Kinase erfolgt in Anlehnung an die von Martin et al. veröffentlichten Versuche [105]. Zellen aus exponentieller Wachstumsphase werden mit konditioniertem Medium auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Hierfür werden Suspensionszellen aus Zellkultur-Flaschen, die bis zu einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml wachsen, bei 200 x g abzentrifugiert und mit einer entsprechenden Menge an konditioniertem Medium aufgenommen. Zellen aus der Fermenterkultur müssen mit konditioniertem Medium auf die Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml verdünnt werden. IL-1 β wird aus der Arbeitslösung (1 μ g IL-1 β /ml Medium) im Verhältnis 1:100 den Zellen zugesetzt, so daß die finale Konzentration 10 ng IL-1 β /ml beträgt. Adhärente Zellen werden in der Kulturflasche mit zytokinhaltigem Medium (10 ng IL-1 β /ml) bedeckt. Die Stimulierung erfolgt über einen Zeitraum von 10 min im Brutschrank. Adhärente Zellen werden anschließend trypsiniert. Die weitere Verarbeitung erfolgt bei 4°C bzw. auf Eis (siehe 2.3.9).

Die Stimulierung der Endothelzelllinie ECV-304 zur Induktion von Adhäsionsmolekülen erfolgt mit verschiedenen Konzentration von IL-1 β (0,0001-100 ng/ml) über 24 h. Einen Tag vor dem Beginn der Stimulierung werden die adhärent wachsenden Zellen in einer 48-Loch-Platte mit je $1,5 \times 10^5$ Zellen/Vertiefung in einem Volumen von 0,5 ml ausgesät. Nach 24 h Wachstum wird das Medium abgesaugt und 0,3 ml zytokinhaltiges Medium pro Vertiefung auf die Zellen gegeben. Nach der Stimulierung erfolgt die Fixierung der Zellen und die immunologische Detektion der Adhäsionsmoleküle wie unter 2.5.10 beschrieben.

2.3.9 Zellernte und Aufschluß der Zellen

Lysepuffer: 50 mM Tris, pH 7,4
 50 mM NaCl
 1% (w/v) Brij 97

Für eine Immunopräzipitation von EL4-6.1, Jurkat E6.1 oder Würzburg werden 2×10^7 Zellen eingesetzt, von den adhären wachsenden Zellen ECV-304 und HepG2 werden 1×10^7 Zellen verwendet. Ein entsprechendes Volumen der Zellkultur bzw. der trypsinisierten Zellen (nichtstimuliert oder mit IL-1 stimuliert) wird bei $200 \times g$ abzentrifugiert (7 min, 4°C). Nach dem zweimaligen Waschen der Zellen mit gekühltem PBS (mindestens 2 ml PBS/ 2×10^7 Zellen) wird das Zellpellet in kaltem Lysepuffer resuspendiert (pro Immunopräzipitationsansatz 750 μl Lysepuffer) und 30 min bei 4°C über Kopf rotiert (Rotationsinkubator, GBF-Eigenbau). Die Zelltrümmer werden durch eine Zentrifugation abgetrennt ($20\,000 \times g$, 30 min, 4°C) und der Überstand (= Zellextrakt) sofort weiterverwendet (siehe 2.5.7) oder bei -80°C gelagert.

2.3.10 Transfektion

Um eukaryontische Zellen mit Plasmid-DNA zu transfizieren, wird die Methode der Liposomentransfektion oder der Elektroporation eingesetzt. Bei dem Liposomen-vermittelten Gentransfer wird die DNA in einer Phospholipid-Doppelschicht eingekapselt. Gelangen diese DNA-beladenen Liposomen in Kontakt mit den zu transfizierenden Zellen, verschmelzen sie mit den Lipiden der Zellmembran, so daß die DNA in die Zelle gelangen und sich in das Zellgenom integrieren kann [79]. Bei der Elektroporation setzt man die Zellen in Gegenwart von Plasmid-DNA kurzzeitig einer hohen Spannung aus. Dadurch wird die Zellmembran vorübergehend durchlässig und die DNA kann das Zellinnere erreichen [136].

Die DNA für die Transfektionen wird, wie unter 2.6.3 beschrieben, isoliert und in TE-Puffer in einer Konzentration von 1-2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ resuspendiert.

2.3.10.1 Liposomentransfektion

Die Liposomentransfektion wird für die Transfektion von ECV-304 mit dem *Antisense*-Konstrukt (siehe 3.6.4) eingesetzt. Das verwendete LIPOFECTAMIN-Reagenz (GIBCO) ist eine 3:1 (w/w) Mischung des polykationischen Lipids 2,3-Dioleyloxy-N-[2(Sperminecarbox-amido)ethyl]-N,N-Dimethyl-1-Propanaminium-Trifluoroacetate (DOSPA) und des neutralen Lipids Dioleoyl-Phosphatidylethanolamine (DOPE).

24 h vor der Transfektion wird eine 6-Loch-Platte mit $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Vertiefung in 2 ml Wachstumsmedium angesät. Für jeden Transfektionsansatz wird 1,5 μg DNA in 100 μl serumfreiem Medium (OPTI-MEM, GIBCO) und 10 μl LIPOFECTAMIN-Reagenz in weiteren 100 μl serumfreiem Medium angesetzt. Beide Lösungen werden vorsichtig gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die zu transfizierenden Zellen werden mit 2 ml serumfreiem

Medium gewaschen, anschließend wird 0,8 ml serumfreies Medium auf die Zellen gegeben. Die DNA/Liposomen-Lösung wird hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Die Zellen werden 4 h im Brutschrank mit den DNA/Liposomen-Komplexen inkubiert, danach wird das Medium abgesaugt und durch serumhaltiges Wachstumsmedium ersetzt. Nach 24 h wird das Medium nochmals gewechselt.

2.3.10.2 Elektroporation

Für die Transfektion von Suspensionszellen und die Transfektion von ECV-304 mit den Konstrukten zur Überexpression der ATPase-Domäne und der Substraterkennungsdomäne (siehe 3.7.2) werden Elektroporationen durchgeführt.

Pro Elektroporationsansatz werden $0,5-1 \times 10^7$ Zellen eingesetzt. Zur Transfektion von ECV-304 wird eine große Zellkulturflasche (T_{175}) für zwei Elektroporationsansätze verwendet; die Zellen sind ca. eine Woche zuvor aufgetaut worden und noch nicht vollständig konfluent bzw. haben noch nicht ihre maximale Zelldichte erreicht. Von den adhärent wachsenden Zellen wird das Wachstumsmedium abgenommen, und die Zellen werden in serumfreiem Medium abgeschabt, abzentrifugiert ($200 \times g$, 5 min) und mit serumfreiem Medium gewaschen. Ein entsprechendes Volumen einer Suspensionszellkultur wird gleichfalls abzentrifugiert und mit serumfreiem Medium gewaschen. Das Zellpellet wird in 0,4 ml serumfreiem Medium aufgenommen und in eine Elektroporationsküvette (Schichtdicke 0,4 cm, BioRad) überführt. Nun wird 20 µg DNA zu den Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgt die Elektroporation bei 975 µF mit 300 V, daraus ergibt sich eine Zeitkonstante zwischen 30 und 35 msec (Geräte: *Gene PulserII*, *Capacitance Extender Plus* und *Pulse Controller Plus*, BioRad). Anschließend werden die Zellen eines Transfektionsansatzes auf einer 6-Loch-Platte mit 2 ml Wachstumsmedium mit 10% FCS pro Vertiefung verteilt. Nach 24 Stunden wird ein Mediumwechsel (Wachstumsmedium mit 5% FCS) durchgeführt.

2.3.11 Selektion und Isolierung von stabilen Transfektanten

1-2 Tage nach der Transfektion der Zellen beginnt die Selektion auf die Neomycinresistenz, welche auf der eingeführten Plasmid-DNA (pcDNA3) codiert ist. Für ECV-304 wird 600 µg G418/ml Wachstumsmedium eingesetzt, Jurkat E6.1 und Würzburg werden mit 1 mg G418/ml Medium selektioniert. Die Dosis von G418, in deren Gegenwart die nichtresistenten Zellen innerhalb einiger Tage sterben, ist zuvor experimentell ermittelt worden. Um die toten Zellen zu entfernen, wird alle zwei Tage mit PBS gewaschen und das selektive Medium erneuert. Nachdem nach 10-14 Tagen die resistenten Zellen ca. 80% konfluent geworden sind, werden die Zellen von den 6-Loch-Platten abgelöst (0,5 ml Trypsin-Lösung pro Vertiefung) und in sehr geringer Zelldichte in Gewebekulturschalen (Durchmesser 8,3 cm) in selektivem Medium ausgesät. Über zwei Wochen hinweg erfolgt alle 3-4 Tage ein Mediumwechsel, bis sich die vereinzelter Zellen zu Kolonien von etwa 5 mm Durchmesser entwickelt haben. Klar abgegrenzte Klone werden markiert und mit einem Tropfen Trypsin-Lösung kurz bei 37°C

inkubiert. Mit Hilfe eines Klonierungsringes (abgeschnittene 1000 µl Pipettenspitze), der auf den einzelnen Klon gestülpt wird, werden die Zellen mit etwas serumhaltigem Medium von der Platte abgenommen und in die Vertiefung einer 6-Loch-Platte mit 2 ml selektivem Medium überführt. Alle 3-4 Tage wird das Medium gewechselt. Die einzelnen Klone werden in Gegenwart von G418 weiter expandiert, bis je dreimal eine Kryokultur angelegt und RNA isoliert werden kann. Nach der Analyse der RNA (siehe 2.6.18) wird von den interessant erscheinenden Klonen eine *Master*- und eine *Working*-Bank angelegt.

2.3.12 Messung der β -Galaktosidase

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienzen werden Zellen mit einem Plasmid transfiziert, welches das bakterielle Gen lacZ für die Expression des Enzyms β -Galaktosidase unter der Kontrolle des CMV-Promotors trägt. Diese Enzymaktivität läßt sich im Zellextrakt oder als Färbung der ganzen Zelle im Mikroskop nachweisen.

2.3.12.1 Messung im Zellextrakt

β -Gal-Reagenz: 0,12 M Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,0
 1 mM ONPG (Ortho-Nitrophenyl-D-Galaktopyranosid)
 1,2 mM MgCl₂
 50 mM β -Mercaptoethanol

Das Reagenz wird bei -20°C gelagert.

Aufschlußpuffer: 250 mM Tris, pH 8,0

5-15x10⁶ Suspensionszellen bzw. trypsinierte Zellen werden einen Tag nach der Transfektion abzentrifugiert (200 x g, 5 min) und dreimal mit je 20 ml PBS gewaschen. Das Zellpellet wird in 0,1 ml Aufschlußpuffer aufgenommen und zum Aufbrechen der Zellen viermal eingefroren (-20°C) und aufgetaut (37°C). Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer (20 800 x g, 2 min, 4°C) wird der Überstand (= Zellextrakt) abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

50 µl Zellextrakt bzw. Verdünnung des Zellextraktes wird mit 250 µl β -Gal-Reagenz versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 500 µl 1 M Na₂CO₃ gestoppt und die Extinktion bei 420 nm gegen einen entsprechenden Blindwert (50 µl Aufschlußpuffer + 250 µl β -Gal-Reagenz) bestimmt.

2.3.12.2 Galaktosidasefärbung von Zellen

X-Gal-Eisenlösung:	5 mM $K_3Fe(CN)_6$ 5 mM $K_4Fe(CN)_6$ 1 mM $MgCl_2$ /PBS
X-Gal-Stammlösung:	20 mg X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactosid)/ml DMF (N,N-Dimethylformamid)
X-Gal-Färbelösung:	X-Gal-Stammlösung 1:20 in X-Gal-Eisenlösung verdünnen

Die X-Gal-Stammlösung wird bei $-20^{\circ}C$ gelagert, die Eisenlösung ist unter Lichtabschluß bei RT haltbar. Die X-Gal-Färbelösung wird direkt vor dem Gebrauch angesetzt.

Adhärenz wachsende Zellen werden nach der Transfektion in 6-Loch-Platten oder Gewebekulturschalen (Durchmesser 8,3 cm) kultiviert und nach 24 h für die Färbung eingesetzt. Das Wachstumsmedium wird abgesaugt, und die Zellen werden mit PBS (6-Loch-Platte: 3 ml/Vertiefung, Gewebekulturschale: 10 ml) gewaschen. Anschließend erfolgt die Fixierung der Zellen für 10 min bei RT mit 0,05% Glutaraldehyd in PBS (6-Loch-Platte: 1 ml/Vertiefung, Gewebekulturschale: 2 ml). Die Kulturplatten werden nun dreimal mit PBS gewaschen, wobei während des zweiten Waschschrtes 10 min bei RT inkubiert wird. Die Zellen werden mit der frisch angesetzten X-Gal-Färbelösung benetzt (6-Loch-Platte: 0,5 ml/Vertiefung, Gewebekulturschale: 1 ml) und mindestens 2 h bei $37^{\circ}C$ unter Lichtabschluß inkubiert. Die Zellen mit Galaktosidase-Aktivität erscheinen im Mikroskop grünlich-blau gefärbt.

Zur Galaktosidase-Färbung von Suspensionszellen werden 1×10^6 Zellen 24 h nach der Transfektion abzentrifugiert (200 x g, 7 min) und mit 10 ml PBS gewaschen (200 x g, 5 min). Das Zellpellet wird in 1 ml 0,05% Glutaraldehyd aufgenommen und in eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte überführt. Die Platte wird 7 min bei RT inkubiert und dann 3 min mit 200 x g zentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes werden die Zellen dreimal mit 5 ml PBS versetzt und in der Kulturplatte abzentrifugiert (200 x g, 3 min). Während des zweiten Waschschrtes wird 7 min bei RT gewartet. Die Zellen werden wie oben mit X-Gal-Färbelösung benetzt und bei $37^{\circ}C$ inkubiert.

2.4 Arbeiten mit *Escherichia coli*

2.4.1 Stämme

<i>E. coli</i> INV α F' (Invitrogen):	F' end A1 recA1 hsdR17 (r_k^- , m_k^+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA- argF)U169 deoR λ^-
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRA (Stratagene):	Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMP-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac ^c

2.4.2 Sterilisieren

Lösungen thermolabiler Stoffe werden sterilfiltriert (0,22 μ m); alle anderen Lösungen sowie Plastik- und Glasmaterialien werden autoklaviert (120°C, 20 min, 2,1 bar).

2.4.3 Kulturmedien und Antibiotikallösungen

Die sterilisierten Medien sind bei RT haltbar. Die mit Antibiotika versetzten Agarplatten werden bei 4°C bis zu 4 Wochen gelagert.

LB-Medium:	1% Trypton 0,5% Hefeextrakt 170 mM NaCl
SOB-Medium:	2% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄

MgCl₂ und MgSO₄ werden in 100-facher Konzentration angesetzt, sterilfiltriert und dem autoklavierten Medium im Verhältnis 1:100 zugesetzt.

SOC-Medium:	SOB-Medium mit 0,4% Glucose Glucose wird als 40%ige Lösung angesetzt, sterilfiltriert und dem SOB-Medium im Verhältnis 1:100 zugesetzt.
Agarplatten:	20 g Agar / l Medium
Ampicillin (Amp):	Stammlösung: 100 mg/ml H ₂ O Arbeitskonzentration: 100 µg/ml Medium Um das Ampicillin zu lösen, wird der pH-Wert mit NaOH vorsichtig auf pH 8,9 erhöht. Die Lösung wird sterilfiltriert, in Aliquots bei -20°C eingefroren und dem Medium direkt vor Gebrauch zugegeben. Für die Herstellung von Agarplatten wird das Antibiotikum dem Medium kurz vor dem Gießen bei einer Temperatur von ca. 45°C zugesetzt.

2.4.4 Anzucht von Bakterien

Die Bakterien werden in flüssigem LB-Medium unter Schütteln oder auf LB-Agarplatten bei 37°C kultiviert. Kleine Volumina (2-25 ml) werden durch das Übertragen einer Einzelkolonie von einer Kulturplatte angeimpft, größere Volumina (50-200 ml) werden mit einer flüssigen Vorkultur im Verhältnis 1:100 angeimpft.

2.4.5 Konservierung von Bakterien

Bakterien auf Kulturplatten können für einige Wochen bei 4°C gelagert werden. Zur längerfristigen Lagerung von *E. coli* wird 1 ml einer Übernachtskultur mit 50 µl DMSO versetzt und bei -70°C aufbewahrt. Für eine erneute Kultivierung wird die DMSO-Kultur auf Eis aufgetaut und ein Aliquot direkt auf einer Kulturplatte ausgestrichen.

2.4.6 Herstellung von kompetenten Zellen

TB-Puffer:	10 mM PIPES, pH 6,7 55 mM MnCl ₂ 15 mM CaCl ₂ 250 mM KCl
------------	---

2 ml LB-Medium wird mit einer Einzelkolonie (XL1-Blue) von einer Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 100 ml SOB-Medium wird mit 1 ml dieser Übernachtskultur angeimpft und bei 30°C bis zu einer OD_{578nm} von 0,3 - 0,4 weiterkultiviert. Die

Zellsuspension wird 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 1000 x g (10 min, 4°C) zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 10 ml kaltem TB-Puffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Die Zellen werden nun in 2,8 ml TB-Puffer aufgenommen, 5 min auf Eis gehalten und mit 196 µl DMSO versetzt. Nach 10 min auf Eis werden die Zellen in Aliquots zu 300 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70° gelagert. Zellen des Stammes INVαF' werden direkt als kompetente Zellen von der Firma Invitrogen bezogen.

2.4.7 Hitzeschock-Transformation

Die kompetenten Zellen (XL1-Blue) werden bei RT aufgetaut und anschließend sofort auf Eis gestellt. Pro Transformationsansatz wird 100 µl Zellsuspension verwendet. Die Zellen werden mit 2-4 µl Plasmid-DNA-Lösung versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgt für 45 sec bei 42°C im Wasserbad. Nachdem der Ansatz 2 min auf Eis gehalten wurde, wird den Zellen 200 µl SOC-Medium zugesetzt und 1 h bei 37°C im Schüttelinkubator (200 upm) inkubiert. Aliquots des Transformationsansatzes (10 µl, 50 µl, 200 µl) werden auf entsprechend selektiven Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Von den Zellen des Stammes INVαF', welcher für einige TA-Klonierungen verwendet wird (siehe 2.6.12), werden Aliquots von 50 µl pro Transformation eingesetzt. Bevor diesen Zellen die Plasmid-DNA-Lösung zugesetzt wird, werden die Zellen vorsichtig mit 2 µl 0,5 M β-Mercaptoethanol gemischt. Die weitere Vorgehensweise erfolgt wie oben beschrieben.

Für ein *Blue/white-Screening* (siehe 2.4.8) werden die LB/Amp-Platten ½ h vor dem Ausstreichen der transformierten Zellen mit 200 µl 2% X-Gal/DMF bestrichen.

2.4.8 Blue/white-Screening

Um nach einer Transformation die Zellen, die das eingeführte Plasmid mit dem entsprechenden Insert, von Zellen, die das Plasmid ohne Insert tragen, schnell unterscheiden zu können, wird das *Blue/white-Screening* eingesetzt.

Durch die Insertion eines DNA-Fragmentes in entsprechenden Vektoren wird ein Teil des β-Galaktosidasegens (*lacZ*) in diesem Vektor inaktiviert. Bei dem *lacZ*-Gen des Vektors handelt es sich um ein Fragment des gesamten Gens, welches mit entsprechender Deletion in den Wirtszellen (z.B. Stamm INVαF') vorhanden ist, so daß durch eine α-Komplementation mit dem ununterbrochenen Vektor das funktionsfähige Enzym exprimiert werden kann. Bietet man den Zellen das farblose Substrat der β-Galaktosidase X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid) an, wird diese Verbindung von Zellen mit Vektor ohne Insertion in ein blaues Produkt gespalten, welches als Blaufärbung der jeweiligen Kolonien sichtbar wird. Zellen, welche einen Vektor tragen, dessen *lacZ*-Gen durch den Einbau eines DNA-Fragmentes unterbrochen ist, sind nicht in der Lage, das Substrat zu spalten und erscheinen als farblose bzw. weißliche Kolonien und geben sich so als positive Klone zu erkennen.

Der Stamm INVαF' besitzt keinen *lac*-Repressor, daher muß für das *Blue/white-Screening* kein IPTG als Induktor für den *lac*-Promotor zugegen sein.

2.5 Arbeiten mit Proteinen

2.5.1 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehaltes verschiedener Proben wird das BCA Protein-Test-Reagenz (Pierce) verwendet. Die in diesem Test eingesetzte Bicinchonic Säure (BCA) komplexiert mit dem durch die Biuret-Reaktion (das Protein reagiert im Alkalischen mit Cu^{2+} zu Cu^{1+}) entstehenden Cu^{1+} zu einem lilafarbenen Produkt, dessen Absorption bei 562 nm gemessen werden kann [155].

0,1 ml der zu messenden Proteinprobe wird mit 2 ml Arbeitslösung (Arbeitslösung: 50 Teile Reagenz A + 1 Teil Reagenz B) versetzt und gemischt. Nach 30 min bei 37°C wird der Ansatz auf RT abgekühlt. Die Extinktion bei 562 nm wird gegen eine Referenz, die statt der Proteinlösung den verwendeten Puffer enthält, gemessen. Der Proteingehalt wird mit der Hilfe einer Eichgeraden ermittelt, die mit BSA in dem entsprechenden Puffergemisch (200 µg/ml - 1000 µg/ml) aufgenommen worden ist. Es werden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.5.2 SDS-Gelelektrophorese

Zur Analyse von Proteingemischen werden die Proteine in einer SDS-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt [92].

Auftragspuffer:	0,0625 M Tris, pH 6,8 30% Glycerin 6% (w/v) SDS 15% (v/v) β -Mercaptoethanol 0,04% (w/v) Bromphenolblau
-----------------	---

Auftragspuffer für das PhastSystem:	0,8 M Tris, pH 8,3 4% (w/v) SDS 2% (w/v) Dithiothreitol 4 mM EDTA 0,04% (w/v) Bromphenolblau
-------------------------------------	--

Teilweise werden die Proteinproben unter nicht-denaturierenden Bedingungen aufgetrennt, für diesen Fall wird der Auftragspuffer ohne den Zusatz von β -Mercaptoethanol bzw. Dithiothreitol angesetzt. Die Auftragspuffer werden in Aliquots bei -20°C gelagert.

1 x Laufpuffer: 25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1% (w/v) SDS

Der Laufpuffer wird als 10-fache Stammlösung angesetzt und bei RT gelagert.

Bis/Acrylamidlösung (Rotiphorese Gel 30, Roth): 30% (w/v) Acrylamid
0,8% (w/v) N,N-Methylenbisacrylamid

Trenngel	7,5%	10%	12%	15%
H ₂ O	7,5 ml	6,1 ml	5,1 ml	3,6 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml
Bis/Acrylamidlösung	3,8 ml	5 ml	6 ml	7,5 ml
10% SDS	150 µ	150 µl	150 µl	150 µl
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
25% APS	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

Sammelgel	5,1%
H ₂ O	2,9 ml
0,5 M Tris, pH 6,8	1,25 ml
Bis/Acrylamidlösung	0,85 ml
10% SDS	50 µl
TEMED	10 µl
25% APS	15 µl

APS (Ammoniumpersulfat) und TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) werden den Gellösungen direkt vor dem Gießen zugesetzt. Sofort nach dem Gießen des Trenngels wird die Lösung mit Wasser überschichtet. Nachdem die Polymerisation beendet ist (ca. 30 min), wird das Wasser entfernt und das Sammelgel gegossen.

Homogene Gele werden mit einer Vorrichtung von Biometra gegossen (Gelzusammensetzung s.o.). Die Größe der Gele beträgt 7 x 11 cm bei einer Schichtdicke von 1 mm. Die Elektrophorese der für Proteinsequenzierungen bestimmten Proben wird mit vorgefertigten Gradientengelen (10-27%, Gelgröße: 8 cm x 8 cm, Schichtdicke: 1,5 mm) der Firma NOVEX durchgeführt. Für die elektrophoretische Probenauftrennung mit anschließender Silbernitrat-Färbung werden Fertiggele (Gradientengele 8-25%, Gelgröße: 4,3 cm x 5 cm, Schichtdicke: 0,45 mm) und das automatisierte PhastSystem von Pharmacia eingesetzt.

Zur Probenvorbereitung werden die Proteinproben im Verhältnis 1:2 mit Auftragspuffer versetzt und für 10 min auf 100°C erhitzt. Um Proteine vor der Elektrophorese gegebenenfalls zu konzentrieren, wird eine Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) durchgeführt. Die Proteinlösung wird hierfür mit 1/10 des Probenvolumens einer 55%igen TCA-Lösung versetzt und mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Die präzipitierten Proteine werden abzentrifugiert (20 800 x g, 5 min), in einem entsprechenden Volumen an Auftragspuffer aufgenommen und für 10 min gekocht. Nach dem Auftragen der Proben in die Taschen des Gels (Biometra- oder NOVEX-System) wird die Elektrophorese bei 80 V bis zum Eintritt der Proben in das Trenngel durchgeführt. Danach wird die Spannung auf 120 V erhöht. Der Lauf wird beendet, wenn die Laufmittelfront das Ende des Gels erreicht hat.

Die Gele für das PhastSystem werden mit Hilfe von Wasser luftblasenfrei auf die Elektrophoresefläche der Trennungseinheit aufgelegt, die Pufferstreifen (3%ige Agarose-Gelstreifen, Puffer: 0,2 M TRICINE, 0,2 M Tris, 0,55% (w/v) SDS, pH 8,1) in die entsprechende Halterung eingefügt und die Elektroden aufgesetzt. Die Auftragskämme werden mit je 1 µl vorbereiteter Proteinprobe beschickt und in die Apparatur eingehängt. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Gele in der Entwicklungseinheit des PhastSystems automatisch gefärbt (siehe 2.5.4.2).

Als Proteinstandard wird ein *low molecular weight calibration kit* (Pharmacia), bestehend aus folgenden Proteinen, verwendet:

Phosphorylase b	94 kD
Albumin	67 kD
Ovalbumin	43 kD
Carbonic-Anhydrase	30 kD
Trypsin-Inhibitor	20,1 kD
α-Lactalbumin	14,4 kD

Für Coomassie-Färbungen wird das Proteingemisch eines Röhrchens des LMW-Kits mit 500 µl reduzierendem Auftragspuffer aufgenommen und 5 min bei 100°C gekocht. Die Lösung wird aliquotiert und bei -20°C gelagert. Bei Verwendung von 10 µl dieses Proteinmarkers sind die einzelnen Banden nach Coomassie-Färbung gut sichtbar.

Zur Herstellung eines Proteinstandards für Gele des PhastSystems, welche mit Silbernitrat gefärbt werden, wird das Proteingemisch eines Röhrchens des LMW-Kits mit 100 µl reduzierendem Auftragspuffer für das PhastSystem aufgenommen, 1:200 mit dem Auftragspuffer verdünnt, 5 min bei 100 °C gekocht und in Aliquots bei -20°C gelagert. Von dieser Lösung wird 1 µl für die Gele des PhastSystems eingesetzt.

2.5.3 Proteintransfer auf Membranen

Um bestimmte Proteine mit Antikörpern nachzuweisen oder um ein Protein aminoterminal ansequenzieren zu können, müssen die Proteine auf eine Membran übertragen werden. Durch die negative Ladung der Proteine nach der SDS-Gelelektrophorese können sie mit Hilfe eines elektrischen Feldes transferiert werden. Für Western-Blots wird das *Semi Dry Blotting* eingesetzt. Aufgrund der größeren Effizienz des Transfers durch die Möglichkeit der längeren Laufzeiten wird zum Blotten für die Ansequenzierung von Proteinen der Tank-Transfer gewählt.

2.5.3.1 *Semi Dry Blotting*

1 x Transferpuffer: 50 mM Tris
 39 mM Glycin
 0,037% (w/v) SDS
 20% (v/v) Methanol

Der Transferpuffer wird als 10-fache Stammlösung ohne Methanol angesetzt und bei RT gelagert.

Nach erfolgter SDS-Gelelektrophorese (siehe 2.5.2) wird das Gel etwa 10 min in Transferpuffer equilibriert. Währenddessen wird eine auf entsprechende Größe geschnittene PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) kurz mit Methanol befeuchtet und in Transferpuffer für einige Minuten geschwenkt. Sechs Filterpapiere (Whatman 3MM Chr) in Gelgröße werden ebenfalls in Transferpuffer getränkt. Nachdem die Graphitplatten der Blot-Apparatur (Werkstatt der GBF) mit Transferpuffer befeuchtet worden sind, werden auf die Anode luftblasenfrei drei Lagen Filterpapier, ein oder zwei Membranen, das Gel und weitere drei Lagen Filterpapier aufgelegt. Nach dem Schließen der Blot-Apparatur erfolgt der Transfer der Proteine über 2 h mit 150 mA (entspricht ca. 2 mA/cm² Membranfläche).

2.5.3.2 Tank-Transfer

1 x Transferpuffer: 12 mM Tris
 96 mM Glycin
 0,05% (w/v) SDS

Der Transferpuffer wird als 10-fache Stammlösung angesetzt und bei RT gelagert.

Für den Tank-Transfer von Proteinen wird das Blot-Modul des Xcell II-Systems der Firma NOVEX benutzt. Die Vorbereitung von Gel, Membran und Filterpapier wird, wie unter 2.5.3.1 beschrieben, vorgenommen. Zusätzlich werden vier Schwämme in Gelgröße mit Transferpuffer getränkt. Zwei der gesättigten Schwämme werden auf die Kathoden-Platte aufgelegt. Nun folgen zwei Lagen Filterpapier, das Gel, ein oder zwei Membranen, zwei Lagen Filterpapier und weitere zwei Schwämme. Nach dem Ausrollen der Luftblasen wird das Blot-Modul geschlossen, in die entsprechende Vorrichtung eingesetzt und mit Transferpuffer aufgefüllt. Der Proteintransfer erfolgt unter kühlenden Bedingungen für etwa 20 h bei 200 mA.

2.5.4 Proteinfärbungen

Die Anfärbung von Proteinen nach der Auftrennung durch eine SDS-Gelelektrophorese geschieht entweder mit Coomassieblau oder mit Silbernitrat. Die Silbernitrat-Färbung ist ungefähr 50 mal empfindlicher als die Coomassieblau-Färbung, deren Nachweisgrenze bei 0,3-1 µg Protein/Bande liegt.

Um die Effizienz des Proteintransfers auf eine Membran zu überprüfen, wird im Anschluß an das Blotten die reversible Ponceaurot-Färbung durchgeführt. Proteinbanden, die für eine Ansequenzierung verwendet werden sollen, werden durch eine Coomassieblau-Färbung der Membran sichtbar gemacht.

2.5.4.1 Coomassieblau-Färbung

0,2%ige Coomassie-Stammlösung: 1 Tablette PhastGel Blue R (Pharmacia) + 80 ml Wasser
5-10 min rühren
+120 ml Methanol

Die Lösung ist bei 4°C für einige Wochen stabil.

Entfärber: 3 Teile Methanol + 1 Teil Essigsäure + 6 Teile Wasser

Färbelösung: 1 Teil der 0,2%igen Stammlösung + 9 Teile Entfärber

Für die Färbung von Polyacrylamid-Gelen werden diese 1 h in Färbelösung und 1-2 h in Entfärber geschwenkt. Zur Anfärbung von auf Membranen transferierten Proteinen wird die Membran 1-2 min in Färbelösung gelegt und anschließend 1 h in Entfärber entfärbt.

2.5.4.2 Silbernitrat-Färbung

Die Silbernitrat-Färbung von Gelen wird in automatisierter Form in der Entwicklungskammer des PhastSystems durchgeführt. Folgende Lösungen werden dafür benötigt:

Fix 1:	34,5 g Sulfosalicylsäure + 115 g Trichloressigsäure in 300 ml Methanol lösen auf 1 l mit Wasser auffüllen
Fix 2:	500 ml Methanol + 100 ml Essigsäure + 400 ml Wasser
Fix 3:	200 ml 25% Glutaraldehyd + 300 ml Wasser
Wasch 1:	50 ml Methanol + 950 ml Wasser
Wasch 2:	Wasser
Wasch 3:	100 ml Essigsäure + 900 ml Wasser
Färbelösung:	105 ml 0,1 M NaOH + 7,5 ml 25%ige Ammoniaklösung langsam unter Rühren 10 ml 20% (w/v) Silbernitrat dazugeben und mit Wasser auf 500 ml auffüllen
Entwickler:	200 ml Wasser + 100 µl Citronensäure + 100 µl 37% Formaldehyd
Konservierer:	100 ml 87% Glycerin + 900 ml Wasser

Der Entwickler wird für jede Färbung frisch angesetzt, alle anderen Lösungen sind bei 4°C lagerbar.

Die Färbung wird mit folgender Methode durchgeführt:

Schritt	Lösung	Zeit	Temperatur
1	Fix 1	3 min	20°C
2	Fix 2	1 min	50°C
3	Fix 2	3 min	50°C
4	Wasch 1	0,5 min	50°C
5	Wasch 1	0,5 min	50°C
6	Fix 3	6 min	50°C
7	Wasch 1	2,5 min	50°C
8	Wasch 1	4 min	50°C
9	Wasch 2	2 min	50°C
10	Wasch 2	3 min	50°C
11	Färbelösung	5 min	40°C
12	Wasch 2	1,2 min	30°C
13	Entwickler	0,5 min	30°C
14	Entwickler	3,2 min	30°C
15	Wasch 3	1,5 min	50°C
16	Konservierer	1,4 min	50°C

2.5.4.3 Ponceaurot-Färbung

0,1%ige Ponceau-Färbelösung: 2%iges Ponceau S-Konzentrat (Sigma) 1:20 in Wasser verdünnen

Die Färbelösung wird bei RT gelagert und ist mehrfach wiederzuverwenden.

Die Färbung einer geblotteten Membran erfolgt für 2 min in 0,1%iger Ponceau-Färbelösung. Anschließend wird die Membran kurz in Wasser entfärbt, so daß Proteinbanden zu erkennen sind, welche mit Nadelstichen markiert werden können. Die vollständige Entfernung des Farbstoffes erfolgt in PBS.

2.5.5 Konservierung von Polyacrylamid-Gelen

Die gefärbten Gele (Biometra, NOVEX) werden mindestens 10 min in Wasser und 10 min in technischem Ethanol geschwenkt. Anschließend werden die Gele zwischen zwei angefeuchteten Folien eingespannt und über Nacht bei RT getrocknet.

Die Gele des PhastSystems werden nach der Färbung bei RT getrocknet und in Dia-Rahmen eingeklemmt.

2.5.6 Western-Blot

Mit der Methode des Western-Blot können einzelne Proteine immunologisch nachgewiesen werden. Ein primärer Antikörper bindet das auf einer Membran immobilisierte Antigen. Der sekundäre Antikörper, welcher mit einer enzymatischen Aktivität gekoppelt ist, bindet den primären Antikörper. Durch eine Inkubation in einer entsprechenden Substratlösung wird die Bande des Antigens sichtbar.

primäre Antikörper:	monoklonaler Anti-Hsp70-Antikörper aus der Maus (Ascites-Flüssigkeit), Klon BRM-22 (Sigma)
	monoklonaler Anti-Hsp70-Antikörper aus der Maus (Ascites-Flüssigkeit), Klon SPA-810 (StressGen)
	monoklonaler Anti-Hsp70-Antikörper aus der Maus, Klon 3a3 (freundlicherweise von R. I. Morimoto zur Verfügung gestellt) [10]
	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen ein carboxyterminales Peptid von Mortalin (Serum), Anti-Mot (siehe 2.5.13)
sekundäre Antikörper:	polyklonaler Anti-Kaninchen IgG (gesamtes Molekül) aus der Ziege, affinitätsgereinigt und mit alkalischer Phosphatase konjugiert (Sigma)
	polyklonaler Anti-Maus IgG (gesamtes Molekül) aus der Ziege, affinitätsgereinigt und mit alkalischer Phosphatase konjugiert (Sigma)

Das Proteingemisch wird durch eine SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert (siehe 2.5.3.1). Nach einer Ponceau-Färbung und Markierung der Standardproteine (siehe 2.5.4.3) wird die Membran vollständig in PBS entfärbt und ü. N. bei 4°C mit 10% FCS in PBS abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen in PBS erfolgt die Inkubation im primären Antikörper für 1 h bei 37°C.

Die verschiedenen Antikörper werden in folgenden Verdünnungen in 10% FCS/PBS eingesetzt:

BRM-22:	1:1000
3a3:	1:10 000
SPA-810	1:1000
Anti-Mot:	1:500

Die Antikörperlösungen der primären Antikörper in 10% FCS/PBS werden nach der Benutzung mit 0,02% Na-Azid versetzt und sind auf diese Weise bei 4°C über mehrere Wochen haltbar und wiederzuverwenden.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS wird die Membran im sekundären Antikörper für 1 h bei 37°C inkubiert. Je nach der Natur des primären Antikörpers wird ein Anti-Maus- (1:10 000 in 10% FCS/PBS) oder ein Anti-Kaninchen-Antikörper (1:10 000 in 10% FCS/PBS) eingesetzt. Die sekundären Antikörper sind mit einer alkalischen Phosphatase (AP) konjugiert. Die Membran wird fünfmal mit PBS gewaschen, bevor die Enzymreaktion in einer AP-Substratlösung (BCIP und NBT in stabilisierendem Puffer, Promega) durchgeführt wird. Die Farbreaktion wird nach 5-10 min mit Wasser gestoppt und die Membran bei RT getrocknet. Die gefärbte Membran wird unter Lichtabschluß aufbewahrt, so daß die Färbung über mehrere Monate nicht verblaßt.

2.5.7 Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation des IL-1-Rezeptors und der Kinasetest der rezeptorassoziierten Kinase (siehe 2.5.8) werden in Anlehnung an die Arbeiten von Martin et al. durchgeführt [105] .

PBS:	10 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,4 138 mM NaCl 3 mM KCl
Lysepuffer:	50 mM Tris, pH 7,4 50 mM NaCl 1% (w/v) Brij 97
Kinasepuffer:	20 mM HEPES, pH 6,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 5 mM MnCl ₂
Protein G-Sepharose:	1 ml Protein G-Sepharose + 1 ml PBS 2 min bei 1000 x g zentrifugieren und Überstand abnehmen zweimal waschen mit 1 ml PBS zweimal waschen mit 1 ml Lysepuffer Sepharose + 1 ml Lysepuffer + 3 µl 20% Na-Azid

Antikörper:	gereinigter monoklonaler Antikörper aus der Ratte gegen den Maus-Interleukin-1-Rezeptor (TypI/p80), Klon 12A6 , 0,5 µg/µl (Pharmingen)
	gereinigter monoklonaler Antikörper aus der Ratte gegen den Mensch-Interleukin-1-Rezeptor (TypI/p80), Klon 6B5 , 0,5 µg/µl (Pharmingen)

750 µl Zellextrakt aus stimulierten oder nichtstimulierten Zellen (siehe 2.3.8) wird mit 1 µg des IL-1-rezeptorspezifischen monoklonalen Antikörpers (12A6 für murine Zellen, 6B5 für humane Zellen) versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert (Rotationsinkubator, GBF-Eigenbau). Der Ansatz wird mit 50 µl Protein G-Sepharose versetzt und 2 h bei 4°C rotiert. Um die Sepharose zu sedimentieren, wird die Suspension bei 4°C für 2 min mit 1000 x g zentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes wird das Immunopräzipitat viermal mit je 1 ml kaltem Lysepuffer und zweimal mit 1 ml kaltem Kinasepuffer gewaschen (1000 x g, 1 min, 4°C). Die gewaschenen Immunopräzipitate werden entweder sofort weiterverwendet (siehe 2.5.2 oder 2.5.8) oder bei -80°C gelagert.

Die Immunopräzipitation des IL-1-Rezeptorkomplexes, welche zur Ansequenzierung der Proteine eingesetzt werden soll, wird dahingehend modifiziert, daß der Gehalt an Antikörper im Proteinkomplex verringert wird. Zu diesem Zweck werden die intakten Zellen nach dem Waschen in PBS aufgenommen und mit dem Anti-IL-1RI-Antikörper inkubiert. Anschließend werden die Zellen ausgiebig mit PBS gewaschen und in Lysepuffer aufgeschlossen. Der Ansatz wird mit Protein G-Sepharose versetzt und die weitere Immunopräzipitation wie üblich durchgeführt.

Für die Immunopräzipitation im präparativen Maßstab zur Ansequenzierung von Proteinen aus dem Rezeptorkomplex werden Zellen aus einer Durchflußfermenter-Kultur eingesetzt (siehe 2.3.7). 2×10^{10} Zellen, welche mit IL-1 stimuliert sind, werden mit PBS gewaschen und in 375 ml PBS aufgenommen. Die Zellen werden mit 1000 µl 12A6 versetzt und über Nacht bei 4°C rotiert. Nach dem mehrfachen Waschen der Zellen mit insgesamt 2 l gekühltem PBS erfolgt der Aufschluß der Zellen mit 375 ml Lysepuffer wie üblich. Zur Präzipitation des IL-1-Rezeptorkomplexes wird der Ansatz mit 12,5 ml Protein G-Sepharose für 2 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wird die Protein G-Sepharose durch Zentrifugation sedimentiert und das Immunopräzipitat viermal mit je 500 ml Lysepuffer und zweimal mit je 500 ml Kinasepuffer gewaschen. Um die Proteine von der Protein G-Sepharose abzulösen, wird das Immunopräzipitat mit 12,5 ml denaturierendem Auftragspuffer ohne Glycerin und Bromphenolblau (30 mM Tris, pH 6,8; 1,4% (w/v) SDS; 2,2% (v/v) β-Mercaptoethanol) versetzt und 10 min auf 100°C erhitzt. Nach dem Abzentrifugieren der Protein G-Sepharose (20 000 x g, 10 min) wird der Überstand abgenommen und über eine Membran mit einer Ausschlußgrenze von 10 kD auf ein Volumen von ca. 500 µl eingengt. Hierfür werden zwei Centricon-Konzentratoren (Amicon) eingesetzt, die jeweils mit 2 ml beschickt und über mehrere Stunden bei 4000 x g zentrifugiert werden. Zwischendurch wird immer wieder das Filtrat entfernt und nichtkonzentrierte Proteinprobe aufgefüllt. Gegen Ende der Konzentrierung werden die Retentate beider Centricon-Konzentratoren vereinigt und weiter eingengt. Das Konzentrat wird mit etwas Glycerin und Bromphenolblau versetzt, bevor es in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Membran transferiert wird.

2.5.8 Kinasemessung

Die Enzymaktivität der durch IL-1 stimulierbaren Kinase im IL-1RI-Immunopräzipitat wird durch die Übertragung des γ -Phosphates aus ^{32}P - γ -ATP oder ^{33}P - γ -ATP auf die exogenen Substrate MBP (*myelin basic protein*) und H1 (Histon-1) sowie auf ein endogenes Substrat bestimmt. Die Abtrennung des nicht-hydrolysierten radioaktiven ATP erfolgt durch SDS-Gelelektrophorese [105] oder über eine Phosphocellulose-Membran [173, 64].

Kinasepuffer:	20 mM HEPES, pH 6,5
	100 mM NaCl
	5 mM MgCl_2
	5 mM MnCl_2

MBP from bovine brain:	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Kinasepuffer
------------------------	--

H1 from calf thymus:	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Kinasepuffer
----------------------	--

2.5.8.1 Kinasetest mit SDS-Gelelektrophorese

Die mit Kinasepuffer gewaschenen Immunpräzipitate (siehe 2.5.7) werden jeweils mit 45,5 μl Kinasepuffer, 2 μl MBP, 2 μl H1, 0,5 μl 100 μM ATP und 1-2 μCi ^{32}P - γ -ATP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol, DuPont NEN) versetzt. Puffer, Substrate und Radioaktivität werden für alle zu messenden Proben als ein gemeinsamer *Master-Mix* angesetzt und zu 50 μl auf die Immunpräzipitate verteilt. Die Phosphorylierungsreaktion erfolgt bei 30°C für 10 min. Anschließend wird 50 μl denaturierender Auftragspuffer auf den Ansatz gegeben, gemischt und 10 min auf 95°C erhitzt. Nach dem Abzentrifugieren der Protein G-Sepharose (20 800 x g, 10 min) wird ein Aliquot des Überstandes auf ein Polyacrylamid-Gel gegeben und die Elektrophorese, wie unter 2.5.2 beschrieben, durchgeführt. Hierfür werden Fertiggele der Firma NOVEX (10% oder 10-27%, Schichtdicke: 1,5 mm) eingesetzt. Als Größenstandards werden [^{14}C]methylierte Proteine (Amersham Buchler) verwendet. Kurz bevor die Blaufront aus dem Gel läuft, wird die Elektrophorese beendet. Um das überschüssige radioaktive ATP zu entfernen, wird der untere Zentimeter des Gels abgetrennt und entsorgt. Nach dem Trocknen des Gels in Ethanol (siehe 2.5.5) wird ein Film aufgelegt (KODAK Biomax MR) und bei -80°C exponiert. Die Entwicklung erfolgt in einem automatischen Filmentwickler (Protec M45, INTAS).

2.5.8.2 Kinasetest mit Phosphocellulose-Einheiten

Die Aktivitätsbestimmungen zur Charakterisierung der Kinase werden mit Hilfe von Phosphocellulose-Einheiten (PIERCE) durchgeführt. Pro Reaktionsansatz wird 0,3-0,5 μCi ^{33}P - γ -ATP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol, DuPont NEN) eingesetzt. Puffer, Substrate und Radioaktivität werden, wie oben beschrieben, als *Master-Mix* für alle Proben angesetzt und auf

die Immunopräzipitate gegeben. Die Phosphorylierungsreaktion erfolgt standardmäßig für 60 min bei 30°C oder wie angegeben. Danach wird der Ansatz gemischt und 25 µl der Suspension in die Phosphocellulose-Einheit gegeben. Nach Zentrifugation bei 20 800 x g für 1 min wird das die Membran enthaltende Körbchen mit 500 µl 75 mM Phosphorsäure versetzt und erneut zentrifugiert. Nachdem das Körbchen in ein neues Gefäß überführt wurde, wird der Waschvorgang einmal wiederholt. Die Phosphocellulose-Einheit wird in ein Szintillationsgefäß gegeben, mit 9 ml Szintillationsflüssigkeit bedeckt und die cpm im Szintillationszähler gemessen.

Als Substratstandard werden die cpm von 10 µl des *Master-Mix* in Szintillationsflüssigkeit in einer Dreifachbestimmung gemessen. Aus dem Durchschnittswert wird auf die eingesetzte Menge an Reaktionsgemisch hochgerechnet und unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren der ATP-Umsatz pro Immunopräzipitat nach folgender Formel errechnet:

$$\text{pmol ATP h}^{-1} \text{ IP}^{-1} = \frac{50 \times (\text{gemessene cpm} \times 3)}{\text{cpm von 50 µl Substratstandard}}$$

2.5.9 *In vitro*-Behandlungen des Immunopräzipitates

(i) Zur Markierung von ATP-bindenden Proteinen wird das IL-1RI-Immunopräzipitat mit dem radioaktiv markierten ATP-Analog 5'-(4-Fluorosulfonylbenzoyl)adenosin (FSBA) behandelt. Untersuchungen zur Hemmung der rezeptorassoziierten Kinase durch das ATP-Analog werden mit nichtradioaktivem Material durchgeführt.

(ii) Durch die Inkubation des Immunopräzipitates mit Nukleotidlösungen wird die Dissoziation von Mortalin aus dem Proteinkomplex untersucht.

Kinasepuffer:	20 mM HEPES, pH 6,5
	100 mM NaCl
	5 mM MgCl ₂
	5 mM MnCl ₂

Inkubationspuffer:	20 mM HEPES, pH 6,5
	100 mM NaCl

2.5.9.1 FSBA-Behandlung

Das nichtradioaktive FSBA wird als 20 mM Stammlösung in DMF für jeden Versuch frisch angesetzt. Die verschiedenen Arbeitskonzentrationen werden als 10%ige DMF-Lösungen in Kinasepuffer oder in Inkubationspuffer, wie bei den entsprechenden Versuchen in 3.1.2 angegeben, hergestellt. Die IL-1RI-Immunopräzipitate (siehe 2.5.7) werden vor der Inkubation mit FSBA mit dem jeweilig verwendeten Puffer (Kinasepuffer oder Inkubationspuffer) zweimal gewaschen. Nach dem Absaugen des Überstandes wird 50 µl der FSBA-Lösung zugesetzt und

wie angegeben inkubiert. Anschließend wird zweimal mit je 1 ml Kinasepuffer gewaschen und der *in vitro*-Kinasetest (siehe 2.5.8.2) durchgeführt.

Für die Herstellung von 100 µl einer 2 mM Lösung von 5'-p-[Adenin-8-¹⁴C]-FSBA wird 400 µl des in Ethanol gelösten ¹⁴C-FSBA (40-60 mCi/mmol, DuPont NEN) unter Stickstoffbegasung eingeengt und in 10% DMF/Inkubationspuffer gelöst. Die Immunopräzipitate aus je 2x10⁸ Zellen (nichtstimuliert und mit IL-1 stimuliert) werden jeweils mit 50 µl (= 5 µCi) der 2 mM ¹⁴C-FSBA-Lösung für 1 h bei RT inkubiert, achtmal mit Inkubationspuffer gewaschen und für die SDS-Gelelektrophorese, wie unter 2.5.2 beschrieben, vorbereitet. Die Elektrophorese wird mit einem 10-27%igen Fertiggel (NOVEX) durchgeführt. Als Größenstandards werden [¹⁴C]methylierte Proteine (Amersham Buchler) eingesetzt. Zur Verstärkung des Signals in der Autoradiographie wird das Gel vor dem Trocknen mit EN³HANCE (DuPont NEN) behandelt. Hierfür wird das Gel 1 h in Fixierer (3 Teile Methanol + 1 Teil Essigsäure + 6 Teile Wasser), 1 h in EN³HANCE und 30 min in kaltem Wasser geschwenkt.

2.5.9.2 Behandlung mit Nukleotiden

Für die Versuche zur *in vitro*-Dissoziation von Mortalin aus dem IL-1RI-Komplex durch Behandlung mit Nukleotidlösungen werden je 3x10⁷ Zellen pro Immunopräzipitation eingesetzt. Die Nukleotid-Lösungen werden als 100 mM Stammlösungen in Aliquots bei -20°C gelagert und jeweils nur einmal verwendet. Der mit Kinasepuffer gewaschene Proteinkomplex (siehe 2.5.7) wird mit 200 µl der verschiedenen Nukleotidlösungen in Kinasepuffer unter den angegebenen Bedingungen inkubiert. Um die Protein G-Sepharose zu sedimentieren, wird 1 min bei 20 800 x g zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wird zweimal mit 1 ml Kinasepuffer gewaschen (20 800 x g, 1 min). Die Probe wird mit 10 µl Auftragspuffer für das PhastSystem versetzt, 10 min bei 100°C gekocht, kurz abzentrifugiert und je 1 µl des Überstandes auf ein 8-25%iges SDS-PAGE (PhastSystem, Pharmacia) aufgetragen. Nach der Elektrophorese erfolgt eine Silbernitrat-Färbung (siehe 2.5.2 und 2.5.4.2).

2.5.10 ICAM-Färbung

Das auf der Zelloberfläche exprimierte Adhäsionsmolekül ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*) wird mit entsprechenden Antikörpern nach einer Methode von B. Friedrichs (Dife, Potsdam-Rehbrücke) nachgewiesen.

Antikörper: monoklonaler Anti-Human ICAM-1 (CD54)-Antikörper, Klon 6.5B5 (DAKO)

polyklonaler Anti-Maus IgG (H+L) aus der Ziege, affinitätsgereinigt und Cy3-konjugiert (Dianova)

Einen Tag vor dem Start der Stimulierung werden $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung in 0,5 ml Medium angesät (48-Loch-Platte). Je Meßpunkt werden sechs Parallelproben angesetzt. Die Stimulierung der Zellen erfolgt wie unter 2.3.8 angegeben. Nach 24 h wird das zytokinhaltige Medium abgesaugt, die Platte zweimal mit 1 ml PBS pro Vertiefung gewaschen und die Zellen mit 2% Formaldehyd in PBS (0,5 ml pro Vertiefung) 2 min bei RT fixiert. Danach werden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und 1 min in eiskaltem Methanol (0,25 ml pro Vertiefung) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS werden die Zellen mit Anti-Human ICAM-1 versetzt (75 µl pro Vertiefung); hierfür wird der Antikörper 1:100 in PBS verdünnt. Die Inkubation erfolgt abgedunkelt 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Die Zellen werden dreimal mit PBS bei RT für jeweils 5 min gewaschen. Der zweite Antikörper (Ziege Anti-Maus, mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 konjugiert) wird, wie der erste Antikörper, 1:100 in PBS verdünnt. Es wird 75 µl pro Vertiefung auf die Zellen gegeben. Nach einstündiger Inkubation bei RT werden die Zellen dreimal, wie oben beschrieben, gewaschen. Abschließend wird jede Vertiefung mit 200 µl PBS versetzt und die Platte bei 530/590 nm in einem Fluoreszenzspektrometer (*gain* 70, Cytofluor II, Perseptive) gescannt.

Als Blindwert wird eine Vertiefung der Kulturplatte nicht mit Zellen angesät und im weiteren Verlauf wie der Rest der Platte behandelt. Die Fluoreszenz dieser Messung wird von den anderen Werten subtrahiert.

2.5.11 Statistische Auswertung

Die Daten der Aktivitätsmessungen der rezeptorassoziierten Kinase in EL4-6.1 mit dem Phosphocellulose-Test (siehe 2.5.8.2) sowie die Ergebnisse der ICAM-Expression von ECV-304 (siehe 2.5.10) werden als Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben. Zur Überprüfung von signifikanten Abweichungen zwischen Kontrollwert und jeweiligem Meßwert wird ein zweiseitiger Student's T-Test unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen bei einem Signifikanzniveau von 0,05, wenn nicht anders angegeben, durchgeführt.

2.5.12 Proteinsequenzierung

Für die Ansequenzierung von Proteinen des IL-1-Rezeptorkomplexes wird das Proteingemisch (siehe 2.5.7) durch eine SDS-Gelelektrophorese (NOVEX-System, 10-27%) aufgetrennt und durch einen Tank-Transfer auf eine PVDF-Membran übertragen. Nach Färbung der Membran mit Coomassieblau werden die deutlich sichtbaren Proteinbanden ausgeschnitten.

Die Ansequenzierung der Proteine erfolgt in einem *Applied Biosystems 472A Sequencer (pulse-liquid-mode)* oder in einem *494A Procise HT Sequencer (gas-phase mode)* mit Standardprogrammen des Herstellers. Der tryptische Verdau von p74 aus dem IL-1RI-Immunopräzipitat wird, wie von Fernandez et al. beschrieben, durchgeführt [53]. Nach Auftrennung der Peptide durch HPLC werden die Peptidfraktionen auf Biobrene-behandelte Glasfaserfilter gegeben und mit Standardprogrammen sequenziert. Die Proteinsequenzierungen werden freundlicherweise von M. Kieß (GBF) durchgeführt.

2.5.13 Herstellung von polyklonalen Antikörpern

Um einen spezifischen Antikörper gegen Mortalin zur Verfügung zu haben, wird ein Peptidantikörper in Kaninchen hergestellt. Die 14 Aminosäuren des Carboxyterminus (Pos. 666 - 679) von Mortalin (Sequenz siehe Abb. 58) werden als Peptid synthetisiert und an KLH (*Keyhole Limpet Hemacyanin*) gekoppelt. Hiermit wird ein Kaninchen immunisiert. Die Peptidsynthese, die Kopplung und die Immunisierung wird von der Firma EUROGENTEC durchgeführt.

Die Spezifität der polyklonalen Antikörper im Serum wird durch Western-Blots mit dem Prä-Immunserum, dem Serum einer ersten Blutabnahme nach dreifacher Injektion des Antigens und dem Serum nach einer weiteren Injektion überprüft.

2.5.14 Immunohistochemie

Zur Untersuchung der intrazellulären Verteilung von Mortalin wird (i) eine Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) der markierten Zellen und (ii) eine Immunofluoreszenz-Färbung der Zellen unter Verwendung des Antikörpers Anti-Mot (siehe 2.5.13) eingesetzt. Diese Versuche werden von M. Rohde (GBF) durchgeführt.

Die Zellen (EL4-6.1) werden hierfür sowohl im nichtstimulierten Zustand als auch nach 10 min bzw. 30 min Stimulierung mit IL-1 β (siehe 2.3.8) verwendet. Die Fixierungsbedingungen, unter welchen der Antikörper bindet, sind zuvor in einem Western-Blot getestet worden.

2.5.14.1 Immunoelektronen-Mikroskopie

Die Zellen (EL4-6.1) werden pelletiert und in einer Fixierlösung von 1% Formaldehyd in PBS für 1 h auf Eis fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS werden die Proben mit 1,5%igem Wasseragar vermischt und auf einen Objektträger gegeben. Nach dem Erstarren werden Würfel von etwa 1 mm Kantenlänge geschnitten und mit einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert. Die Entwässerung und Infiltration mit Harzen geschieht in Anlehnung an die *progressive lowering of temperature method* von Roth et al. [143]: 10%, 30% Ethanol auf Eis; 50% Ethanol bei -20°C; 70%, 90% und 100% Ethanol bei -35°C für jeweils 30 min. Als Kunstharz für die Lokalisierungstudien wird Lowicryl K4M Tieftemperatureinbettungsharz (Chem. Werke Lowi GmbH, Waldkraiburg) verwendet. Die Infiltration wird folgendermaßen durchgeführt: 1 Teil 100% Ethanol + 1 Teil K4M über Nacht bei -35°C; 1 Teil Ethanol + 2 Teile K4M für 8 h bei -35°C; reines K4M für 8 h bei -35°C; reines K4M über Nacht bei -35°C; reines K4M für 24 h bei -35°C. Nach dem Überführen der Proben in Gelatine kapseln und Auffüllen mit reinem K4M werden die Proben bei -35°C mit UV-Licht (366 nm) für 24 h polymerisiert. Ultradünnschnitte von etwa 100 nm werden mittels Ultracut S (Leica, Bensheim) mit Glasmessern hergestellt und mit 300 nm *mesh* Nickel-Grids, die mit Formvarfolie beschichtet sind, abgenommen und mit der Schnittseite nach unten auf einen Tropfen Wasser gelegt.

Für die Markierung werden von dem spezifischen Antikörper Anti-Mot, der zuvor über eine Protein A-Säule gereinigt worden ist, Verdünnungsreihen in PBS erstellt. Die Ultradünnschnitte werden auf Tropfen (25 µl) der Antikörperversdünnungen gelegt und in einer Petrischale, die mit Parafilm ausgekleidet ist, über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Grids mit PBS aus einer Spritzflasche gewaschen und nochmals auf Tropfen von PBS für jeweils 10 min gelegt. Danach erfolgt eine Abdeckung mit 0,4%iger Trockenmilchpulver-Lösung, indem die Grids auf Tropfen der Trockenmilchpulver-Lösung für 5 min gelegt und auf einem Filterpapier abgetupft werden. Die Grids werden sofort auf Tropfen (25 µl) der entsprechenden Verdünnungsreihen der elektronendichten Marker (Protein A-Gold Partikel mit einem Durchmesser von 10 nm, British Biocell, Cardiff) für 1 h bei RT inkubiert. Abschließend werden die Grids mit 0,01% Triton X-100/PBS sorgfältig gewaschen, nochmals mit Wasser gespült und luftgetrocknet. Eine Nachkontrastierung erfolgt mit 4% wässrigem Uranylacetat für 10-30 min.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung erfolgt in einem Zeiss STEM910 Transmissionselektronenmikroskop (LEO, Oberkochen) bei 80 kV. Negative werden auf AGFA Scientia-Film belichtet (AGFA, Leverkusen), Abzüge werden auf Ilford Multikontrastpapier erstellt (Ilford, Dreieich).

2.5.14.2 Immunofluoreszenz-Mikroskopie

Die Mitochondrien der Zellen werden mit einem hochspezifischen Mitotracker für lebende Zellen der Firma Molecular Probes (Mitotracker M-7510, Eugene, USA) markiert. Der Mitotracker (50 µg) wird in 1 ml DMSO gelöst und in einer 1:5000 Verdünnung für 30 min zu den in dem Kulturmedium wachsenden Zellen gegeben. Für die Doppellokalisierung des Mortalin-Motives und der Mitochondrien werden die Zellen, wie im folgenden beschrieben, mit 1% Formaldehyd fixiert.

EL4-6.1-Zellen oder EL4-6.1-Zellen, die vorher mit dem Mitotracker behandelt worden sind, werden für 30 min auf Eis mit 1% Formaldehyd in PBS fixiert und anschließend mit 10 mM Glycin in PBS gewaschen. Die fixierten Zellen werden in die Vertiefungen eines 8-Well-Glasobjektträgers (ICN Biomedicals, Aurora, USA), der mit Poly-L-Lysin beschichtet ist, gegeben. Nach 10 min wird kurz mit PBS gespült. Die angehefteten Zellen werden mit 0,05% Triton X-100 in PBS für 1 min inkubiert und erneut mit PBS gewaschen. Der spezifische Antikörper (1:50 Verdünnung des gereinigten Anti-Mot) wird in die Vertiefungen gegeben und für 1 h bei RT in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit PBS werden die gebundenen Antikörper mit einem zweiten Antikörper, der mit FITC gekoppelt ist (1:75 Verdünnung der Stammlösung, DIANOVA), für die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Nach 30 min bei RT werden die Proben mit PBS und Wasser sorgfältig gewaschen und mit einem Einbettungsmittel, das aus in PBS gelöstem Moviol mit DAPCO (0,1 g/ml, DIANOVA) als Antibleichmittel besteht, mit Hilfe von Deckgläschen eingebettet.

Die Konfokalmikroskopie wird mit einem BioRad MRC 1024 System durchgeführt. Die Anregung für die FITC-Markierung erfolgt mit der 488 nm-Linie, für den Mitotracker mit der 568 nm-Linie eines Krypton/Argon-Lasers. Für den grünen Kanal (FITC) und für den roten Kanal (Mitotracker) werden getrennte Schnittserien aufgenommen.

2.6 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.6.1 Sterilisieren

Das für die verschiedenen Lösungen verwendete Wasser wird in einer Milli-Q-Filtrationsanlage aus deionisiertem Wasser aufbereitet. Alle Plastikmaterialien und Lösungen werden autoklaviert (120°C, 20 min, 2,1 bar). Zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNasen bei Arbeiten mit RNA werden Glasgeräte und Glaspipetten 2 h bei 180°C sterilisiert. Pipettenspitzen, andere Plastikmaterialien und Gelelektrophorese-Einheiten werden gesondert nur für RNA-Arbeiten verwendet. Bei allen Arbeitsschritten werden Handschuhe getragen.

2.6.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von wässrigen DNA- oder RNA-Lösungen wird durch die Messung der Absorption bei 260 nm im Spektrophotometer bestimmt. Nach Durchschnittswerten aus der Literatur [124] entspricht eine A_{260} von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml bei doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml bei einzelsträngiger DNA oder RNA. Bei Lösungen von Oligonukleotiden entspricht eine A_{260} von 1,0 einer Konzentration von 33 µg/ml.

Die DNA- und RNA-Lösungen werden für die Messung 1:100 mit Wasser in einem Volumen von 100 µl verdünnt, die Absorption in Quarzküvetten bestimmt und die Konzentrationen unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors errechnet.

Durch Messung der Absorption bei 280 nm kann aus dem Verhältnis A_{260}/A_{280} die Reinheit der DNA- bzw. RNA-Präparation abgelesen werden. Das Verhältnis für eine reine DNA-Lösung liegt bei 1,8, für eine reine RNA-Lösung bei 2,0.

Zur Ermittlung der molaren Konzentration von Oligonukleotiden wird unter der Berücksichtigung des durchschnittlichen Molekulargewichts einer Base von 325 g/mol folgende Formel herangezogen:

$$\frac{x \text{ g/l}}{y \text{ (Basen des Oligonukleotids)} \times 325 \text{ g/mol}} = z \text{ M}$$

2.6.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wird ein Plasmid-Reinigungs-Kit der Firma QIAGEN eingesetzt. Das QIAGEN-Reinigungs-Protokoll basiert auf einer alkalischen Hydrolyse der Zellen mit anschließender Bindung der DNA an ein Anionenaustauscher-Säulenmaterial. RNA, Proteine und andere Verunreinigungen werden durch entsprechende Waschschriffe entfernt, so daß die saubere DNA unter Hochsalz-Bedingungen eluiert werden kann. Mit Hilfe einer Isopropanol-Fällung wird die DNA entsalzt.

Um mehrere Klone nach einer Transformation zu analysieren, werden QIAGEN-*tip* 20 benutzt; hiermit kann bis zu 20 µg DNA gewonnen werden. Für größere DNA-Mengen werden QIAGEN-*tip* 100 oder QIAGEN-*tip* 500 verwendet, um aus 20 ml (100 ml) Bakterienkultur bis zu 150 µg (700 µg) Plasmid-DNA isolieren zu können.

Puffer P1 (Resuspensionpuffer):	50 mM Tris, pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg RNase/ml
Puffer P2 (Lysepuffer):	200 mM NaOH 1% (w/v) SDS
Puffer P3 (Neutralisierungspuffer):	3 M Natrium-Acetat, pH 5,5
Puffer QBT (Equilibrierungspuffer):	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% (v/v) Ethanol 0,15% (v/v) Triton X-100
Puffer QC (Waschpuffer):	1 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% (v/v) Ethanol
Puffer QF (Elutionspuffer):	1,25 M NaCl 50 mM Tris, pH 8,5 15% (v/v) Ethanol
TE-Puffer:	10 mM Tris, pH 8,0 1 mM EDTA

Puffer P1, P3 und TE-Puffer werden bei 4°C, alle anderen Puffer bei RT gelagert.

Für die DNA-Präparation im kleineren Maßstab (*tip* 20 oder *tip* 100) werden 2 ml bzw. 20 ml selektives LB-Medium mit einer Einzelkolonie von einer Agar-Platte angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Kulturen für größere DNA-Präparationen (100 ml für *tip* 500) werden mit einer entsprechenden Vorkultur im Verhältnis 1:100 angeimpft.

Protokoll für QIAGEN-tip 20: 1 ml der Bakteriensuspension wird mit 1000 x g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert und das Zellpellet gründlich in 0,3 ml Puffer P1 resuspendiert. Nach Zusatz von 0,3 ml Puffer P2 wird gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Hinzufügen von 0,3 ml Puffer P3 wird vorsichtig gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Während der Inkubationszeit wird die Probe mehrmals gemischt. Durch Zentrifugation bei 20 800 x g für 15 min bei 4°C trennt sich die Plasmid-DNA von Proteinen und der zellwandgebundenen chromosomalen DNA und verbleibt im klaren Überstand. Dieser Überstand wird auf das mit 1 ml Puffer QBT equilibrierte QIAGEN-tip 20 aufgetragen. Nach viermaligem Waschen mit je 1 ml Puffer QC wird die Plasmid-DNA mit 0,8 ml Puffer QF eluiert. Durch den Zusatz von 0,56 ml Isopropanol wird die DNA gefällt und bei 20 800 x g (30 min, 4°C) pelletiert. Das Pellet wird mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen (20 800 x g, 5 min, 4°C), bei RT getrocknet und in 10 µl TE-Puffer resuspendiert. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgt bei -20°C.

Protokoll für QIAGEN-tip 100 (tip 500): Die Vorgehensweise entspricht bis auf Volumina und Inkubationszeiten weitgehend dem Protokoll für QIAGEN-tip 20. 20 ml (100 ml) Kultur werden mit 5000 x g für 15 min bei 4°C abzentrifugiert und in 4 ml Puffer P1 (10 ml) resuspendiert. 4 ml Puffer P2 (10 ml) wird zugefügt, gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zusatz von 4 ml Puffer P3 (10 ml) wird vorsichtig gemischt und der Ansatz 15 min (20 min) auf Eis gestellt. Das Lysat wird durch Zentrifugation (20 300 x g, 30 min, 4°C) geklärt und der Überstand auf ein zuvor mit 4 ml (10 ml) Puffer QBT equilibriertes QIAGEN-tip 100 (tip 500) aufgetragen. Das Waschen der Säule erfolgt mit 2 x 10 ml Puffer QC (2 x 30 ml). Die Plasmid-DNA wird mit 5 ml Puffer QF (15 ml) eluiert und durch die Zugabe von 3,5 ml Isopropanol (10,5 ml) gefällt. Nach einer Zentrifugation mit 20 300 x g für 30 min bei 4°C wird das Pellet mit 5 ml 70% Ethanol (5 ml) gewaschen (20 300 x g, 10 min, 4°C), getrocknet und in 100 µl TE-Puffer (500 µl) aufgenommen.

2.6.4 Präparation von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturlinien wird nach zwei Protokollen durchgeführt. Die RNA-Isolierung nach einer Methode aus den *Current Protocols in Molecular Biology* (Verlag John Wiley & Sons) erzielt höhere Ausbeuten als die Verwendung von Tri-Reagenz (Molecular Research Center, Inc.).

Beide Methoden beruhen auf dem Einsatz von Guanidinium-Thiocyanat und Phenol zum Aufschluß der Zellen und zum Entfernen der Proteine. Durch die Zugabe von Chloroform wird eine Phasentrennung erreicht, welche die RNA von Proteinen und DNA abtrennt.

2.6.4.1 RNA-Isolierung (aus *Current Protocols in Molecular Biology*)

Denaturierungslösung:	4 M Guanidinium-Thiocyanat
	25 mM Natrium-Citrat, pH 7,0
	0,1 M β-Mercaptoethanol
	0,5% N-Lauroylsarcosine

1×10^7 Suspensionszellen werden abzentrifugiert ($200 \times g$, 4°C , 7 min) und das Zellpellet in 1 ml Denaturierungslösung resuspendiert. Adhärenente Zellen werden bis zur Konfluenz in Zellkulturschalen (8,3 cm Durchmesser) kultiviert, das Medium abgegossen, 1 ml Denaturierungslösung auf die Schale gegeben und die Zellen abgeschabt. Das Homogenat wird in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und 0,1 ml 2 M Natrium-Acetat, pH 4,0 zugesetzt. Nach dem Durchmischen wird 1 ml Wasser-gesättigtes Phenol, nach erneutem Mischen 0,2 ml Chloroform/Isoamyl-Alkohol (49:1 (v/v)) zugegeben und gemischt. Die Suspension wird 15 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 20 min bei $20\,800 \times g$, 4°C wird die RNA-haltige, wässrige obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Isopropanol versetzt. Die Fällung der RNA erfolgt bei -20°C für mindestens 30 min. Der Ansatz wird 10 min bei $20\,800 \times g$, 4°C zentrifugiert, das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol versetzt, 10 min bei RT stehengelassen und erneut 5 min bei $20\,800 \times g$, 4°C zentrifugiert. Nach dem Trocknen des Pellets bei RT wird die RNA in autoklaviertem H_2O gelöst und bei -70°C gelagert.

2.6.4.2 RNA-Isolierung mit Tri-Reagenz

1 ml Tri-Reagenz wird auf die konfluent bewachsene Kulturschale (8,3 cm Durchmesser) gegeben. Die Zellen werden abgeschabt und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach 5 min Inkubation bei RT wird 0,2 ml Chloroform zugesetzt und 15 sec kräftig gemischt. Das Gemisch wird nach 2-15 min bei RT mit $12\,000 \times g$ für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die obere Phase wird in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und mit 0,5 ml Isopropanol versetzt. Während der folgenden 5-10 min bei RT wird der Ansatz mehrmals gemischt. Die präzipitierte RNA wird pelletiert ($12\,000 \times g$, 4°C , 8 min), mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen ($7500 \times g$, 4°C , 5 min) und bei RT getrocknet. Nach der Resuspension in 25-50 μl autoklaviertem H_2O wird die RNA bei -70°C gelagert.

2.6.5 Extraktion mit Phenol/Chloroform

Zur Entfernung von Proteinen und Salzen aus einer DNA-Lösung wird eine Extraktion mit Phenol/Chloroform durchgeführt.

Die zu extrahierende DNA-Lösung wird mit H_2O auf ein Volumen von 50 μl gebracht, mit 50 μl TE-gesättigtem Phenol versetzt, gemischt und 30 sec bei $20\,800 \times g$ zentrifugiert. Nachdem der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt worden ist, wird 50 μl Phenol/Chloroform (1+1) dazugegeben, gemischt und erneut zentrifugiert. Abschließend wird der Überstand mit 50 μl Chloroform versetzt, gemischt, zentrifugiert und der Überstand für die Fällung der DNA mit Ethanol (siehe 2.6.6) weiterverwendet.

2.6.6 Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren

Um DNA-Lösungen zu konzentrieren, zu entsalzen oder umzupuffern wird die DNA mit Ethanol gefällt.

Die Fällung der DNA erfolgt durch die Zugabe von 1/10 des Volumens an 3 M Natrium-Acetat, pH 5,2 und dem dreifachen Volumen an 100% Ethanol bei -20°C für mindestens 2 h. Die DNA wird bei 20 800 x g, 30 min, 4°C sedimentiert, das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in H₂O oder dem gewünschten Puffer resuspendiert. Die Lagerung von DNA erfolgt bei -20°C.

2.6.7 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

In der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente werden unterschiedliche Agarose-Konzentrationen für das Gel benötigt:

% (w/v) Agarose	effektiver Trennungsbereich der DNA-Fragmente (bp)
0,7	800 - 12 000
1,0	500 - 10 000
1,2	400 - 7 000
1,5	200 - 3 000

1 x TBE-Puffer: 90 mM Tris, pH 8,0
 90 mM Borsäure
 2 mM EDTA

TBE-Puffer wird als 10-fache Stammlösung angesetzt und bei RT gelagert.

Stop-Puffer: 50% (v/v) Glycerin
 0,5% (w/v) Bromphenolblau

Die entsprechende Menge von Agarose wird in TBE-Puffer in der Mikrowelle gelöst. Nachdem die Lösung etwas abgekühlt ist, wird 0,5 µl Ethidiumbromid (Stammlösung: 2 mg/ml) pro 50 ml Gellösung zugesetzt und das Gel in einer horizontalen Gelkammer mit einem Probenauftragskamm (Horizontal-Gel-Elektrophorese-Apparatur 5 x 8, 11 x 14, GIBCO BRL)

gegossen. Nach dem Gelieren wird das Gel mit TBE-Puffer als Laufpuffer überschichtet. Die DNA-Proben werden vor dem Auftragen im Verhältnis 6:1 mit Stop-Puffer versetzt. Die Elektrophorese wird bei 100 V durchgeführt, bis der Farbstoff des Stop-Puffers die Mitte der Laufstrecke erreicht hat.

Die DNA-Banden sind unter UV-Licht durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid als orange Banden sichtbar und können mit einem Video Scan-System (HEROLAB) dokumentiert werden.

2.6.8 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Um nach einer enzymatischen Spaltung von DNA bestimmte Fragmente zu isolieren, wird die DNA durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt und das Fragment der gesuchten Größe aus dem Gel extrahiert.

JETSORB Gel-Extraktions-Kit (GENOMED):	JETSORB-Suspension Puffer A1 Puffer A2
--	--

TE-Puffer:	10 mM Tris, pH 8,0 1 mM EDTA
------------	---------------------------------

Die geschnittene DNA (siehe 2.6.9) wird auf einem Agarose-Gel aufgetrennt, wobei die Probe nur mit etwas Glycerin und nicht mit Stop-Puffer versehen worden ist. Das Fragment wird unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten und das Gelstück gewogen. Die Extraktion der DNA erfolgt mit dem JETSORB Gel-Extraktions-Kit der Firma GENOMED.

Pro 100 mg Gelstück wird 300 µl Puffer A1 und 10 µl JETSORB-Suspension zugegeben. Der Ansatz wird gemischt und 15 min bei 50°C inkubiert. Während der Inkubationszeit wird alle 3 min gemischt. Anschließend wird 30 sec bei 20 800 x g zentrifugiert und der Überstand vollständig abgenommen. Nach dem Resuspendieren des Pellets in 300 µl Puffer A1 wird zentrifugiert und das Pellet zweimal mit Puffer A2 auf die gleiche Weise gewaschen. Das Pellet wird bei RT getrocknet und in 20 µl TE-Puffer resuspendiert. Anschließend wird der Ansatz 5 min bei 50°C inkubiert und 1 min bei 20 800 x g zentrifugiert. Der die DNA enthaltende Überstand wird bei -20°C gelagert.

2.6.9 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Zum Schneiden von DNA werden Restriktionsendonukleasen verwendet. Die benötigten Restriktionspuffer werden im allgemeinen von den Herstellern der Enzyme mitgeliefert und entsprechend deren Vorgaben eingesetzt.

Für Spaltungen im analytischen Maßstab wird ca. 1 µg DNA mit 5-10 Units Enzym in einem Volumen von 10 µl im jeweiligen Restriktionspuffer für 1 h bei 37°C inkubiert. 1 Unit ist

definitionsgemäß die Enzymmenge, die in einer Stunde bei 37°C ein Mikrogramm DNA verdaut. Ist eine Spaltung mit zwei Enzymen notwendig, hängt es von den erforderlichen Pufferbedingungen ab, ob der Verdau mit beiden Enzymen in demselben Restriktionsansatz durchgeführt werden kann, oder ob nacheinander mit den einzelnen Enzymen geschnitten werden muß. Im zweiten Fall wird zunächst mit dem Enzym verdaut, welches im Niedrigsalz-Puffer arbeitet; anschließend werden durch den Zusatz der entsprechenden Pufferkomponenten die Bedingungen für das zweite Enzym eingestellt und der nächste Schnitt durchgeführt.

Sollen die Fragmentgrößen der gespaltenen DNA analysiert werden, wird der Restriktionsansatz mit Stop-Puffer versetzt und eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (siehe 2.6.7). Für die Spaltung von DNA, die für eine spätere Fragmentisolierung durchgeführt wird (siehe 2.6.8), wird 5 µg DNA eingesetzt, die in einem Volumen von 10 µl mit 10-20 Units Enzym geschnitten wird. Hierfür wird die Inkubationszeit bei 37°C auf 3 h erhöht.

2.6.10 5'-Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine unerwünschte Religation von einfach geschnittener Vektor-DNA zu vermeiden, werden die überhängenden 5'-Enden mit einer alkalischen Phosphatase aus *Shrimps* (Garnele) dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung findet direkt im Anschluß an die Spaltung der DNA statt. Die DNA-Lösung (3 µg in 20 µl) wird mit 2,5 µl 10 x Phosphatase-Puffer (Amersham USB) und 2,5 µl alkalische Phosphatase (1 Unit/µl, Amersham USB) versetzt. Nach 30 min bei 37°C wird erneut 2,5 µl alkalische Phosphatase zugesetzt und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inaktivierung des Enzyms (65°C, 15 min) wird die DNA mit Phenol/Chloroform extrahiert und gefällt, so daß sie für eine Ligation eingesetzt werden kann.

2.6.11 Ligation

DNA-Fragmente werden mit Hilfe der T4 DNA-Ligase miteinander verknüpft. Linearisierter Vektor und Insert werden in einem äquimolaren Verhältnis eingesetzt; die DNA-Konzentration im Ansatz liegt dabei zwischen 10 und 20 µg/ml. Die Konzentrationsabschätzung für Ligationen von linearisiertem und dephosphoryliertem Vektor sowie von aus Agarose-Gelen isolierten Fragmenten erfolgt durch den Vergleich der Fluoreszenzintensitäten im Agarose-Gel. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß die Bande des Inserts bei äquimolarer Konzentration als schwächere Bande erscheint, da zum einen die Fragmentlänge der Inserts kürzer ist und daher eine gleiche molare Konzentration weniger DNA enthält; zum anderen ist die Ethidiumbromid-Konzentration im Gelbereich der kleineren Fragmente durch das entgegengesetzte Laufverhalten des Farbstoffes geringer und damit die Färbung schwächer.

10 x Ligationspuffer: 60 mM Tris, pH 7,5
 60 mM MgCl₂
 50 mM NaCl
 0,1% (w/v) BSA
 70 mM β -Mercaptoethanol
 1 mM ATP
 20 mM Dithiothreitol
 10 mM Spermidin

Reagenz	Volumen
DNA-Fragment oder frisches PCR-Produkt	x μ l (20-100 ng)
10 x Ligationspuffer	1 μ l
geschnittener Vektor	x μ l (50-300 ng)
steriles Wasser	auf 9 μ l
T4 DNA-Ligase (4 Units/ μ l)	1 μ l

Nach dem Mischen der Reagenzien wird der Ansatz bei 14°C über Nacht inkubiert. Als eine Kontrolle der Selbstligation (siehe 2.6.10) wird ein Ansatz vorbereitet, welcher kein Insert und die doppelte Menge an linearisiertem Vektor enthält. Wenn die Transformation (siehe 2.4.7) nicht im Anschluß durchgeführt wird, kann der Ligationsansatz bei -20°C gelagert werden.

2.6.12 TA-Klonierung

Das Prinzip der TA-Klonierung ermöglicht die direkte Klonierung von PCR-Produkten in einen Plasmid-Vektor. Die Taq-Polymerase, welche die Kettenverlängerung in der Polymerasekettenreaktion (PCR) durchführt, hängt unabhängig vom *Template* ein einzelnes Deoxyadenosin an das 3'-Ende des PCR-Produktes. Durch Verwendung eines linearisierten Vektors, welcher am 3'-Ende ein einzelnes Deoxythymidin enthält, ist die Ligation von PCR-Produkt und Vektor möglich.

Der für diesen Zweck geeignete Vektor pCRII wird von Invitrogen als Komponente des TA-Klonierungs-Kit gebrauchsfertig bezogen. Da der 3'A-Überhang des PCR-Produktes mit der Zeit abgebaut wird, muß für den Ligationsansatz frisches PCR-Produkt eingesetzt werden. Die Ligation erfolgt wie unter 2.6.11 beschrieben.

2.6.13 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription von RNA zu einer cDNA werden Komponenten des GeneAmp RNA PCR-Kit von Perkin Elmer Cetus verwendet.

10 x PCR-Puffer II: 500 mM KCl
 100 mM Tris, pH 8,3

dNTP: 10 mM Lösungen von dATP, dCTP, dGTP und dTTP in H₂O; mit NaOH auf pH 7,0 titriert

Reverse Transkriptase: 50 U/μl (*Moloney Murine Leukemia Virus*)

Reagenz	Volumen	finale Konzentration
25 mM MgCl ₂	4 μl	5 mM
10 x PCR-Puffer II	2 μl	1 x
steriles H ₂ O	1 μl	---
10 mM dATP	2 μl	1 mM
10 mM dCTP	2 μl	1 mM
10 mM dGTP	2 μl	1 mM
10 mM dTTP	2 μl	1 mM
RNase-Inhibitor (20 U/μl)	1 μl	20 U/20 μl
Rev. Transkriptase (50 U/μl)	1 μl	50 U/20 μl
<i>Random Hexamers</i> (50 μM)	1 μl	2,5 μM
Gesamt-RNA (0,5 μg/μl)	2 μl	1 μg/20 μl

Der Reaktionsansatz wird mit Mineralöl überschichtet und 10 min bei RT stehen gelassen. Anschließend wird das Reaktionsgefäß 15 min bei 42°C, 5 min bei 99°C zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase und 5 min bei 5°C in einem DNA-*Thermal Cycler* 480 (Perkin Elmer Cetus) inkubiert. Für eine nachfolgende PCR wird der gesamte Ansatz eingesetzt.

2.6.14 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode, mit der selektiv DNA-Sequenzen vervielfältigt werden können. Das Prinzip beruht auf dem Trennen des DNA-Doppelstranges durch Erhitzen und Verdopplung der dabei entstehenden Einzelstränge mit Hilfe einer DNA-Polymerase. Neben der zu amplifizierenden DNA wird für jeden Strang der Doppelhelix ein Primer benötigt. Durch den Einsatz der hitzestabilen Taq-Polymerase ist es möglich, die Polymerasekettenreaktion in automatisierter Form durchzuführen.

Neben den Komponenten des GeneAmp RNA PCR-Kit, die unter 2.6.13 aufgelistet sind, werden die Taq DNA-Polymerase (5 U/μl, Perkin Elmer Cetus) und für die zu amplifizierende Sequenz spezifische Primer (10 μM in H₂O) benötigt.

Reagenz	Volumen	finale Konzentration
cDNA (siehe 2.6.13)	20 μl	---
25 mM MgCl ₂	4 μl	2 mM
10 x PCR-Puffer II	8 μl	1 x
steriles H ₂ O	65,5 μl	---
Taq DNA-Polymerase (5 U/μl)	0,5 μl	2,5 U/100 μl
<i>upstream</i> Primer (10 μM)	1 μl	0,1 μM
<i>downstream</i> Primer (10 μM)	1 μl	0,1 μM

Das Reaktionsgefäß mit dem PCR-Ansatz wird in einen DNA-*Thermal Cycler* überführt und die PCR-Reaktion mit folgendem Programm gestartet:

Schritt 1:	3 min 95°C,	
Schritt 2:	1 min 95°C, 1 min 55°C, 1 min 72 °C	30 Zyklen
Schritt 3:	7 min 72°C	
Schritt 4:	∞ 4°C	

Nach Ablauf des Programms kann das Mineralöl durch eine Extraktion mit Chloroform entfernt werden. Das PCR-Produkt kann aber auch direkt durch die Ölschicht hindurch entnommen werden. Das Ergebnis der PCR-Reaktion wird überprüft, indem 1/10 des Ansatzes auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und gefärbt wird.

20 x SSC: 3 M NaCl
 300 mM Natrium-Citrat, pH 7,0

Nach der Gelelektrophorese der RNA (siehe 2.6.15) wird das Gel 3 x 10 min in sterilem H₂O und 30 min in 20 x SSC gewaschen. Eine auf Gelgröße zugeschnittene Nylonmembran (Boehringer Mannheim) wird kurz in Wasser und 10-15 min in 20 x SSC equilibriert. Drei Filterpapiere (Whatman 3MM Chr) entsprechender Größe werden in 2 x SSC getränkt. Ein längeres Stück Filterpapier wird auf einen Gelträger gelegt, so daß die Enden in einen Tank mit 20 x SSC als Transferpuffer reichen. Auf diesem Filterpapier wird das Gel blasenfrei mit den Probenaschenöffnungen nach unten platziert und mit der vorbereiteten Nylonmembran bedeckt. Darüber wird eine etwa 10 cm dicke Schicht von Filterpapier und Haushaltspapier gelegt, mit einer Glasplatte abgedeckt und mit einem Gewicht (ca. 2 kg) beschwert. Der ganze Aufbau wird in einem Plastikbeutel eingeschlossen. Der Kapillartransfer erfolgt bei RT über Nacht. Anschließend wird die Membran kurz in autoklaviertem Wasser gespült und zum Fixieren der RNA 30 min bei 120°C gebacken.

2.6.17 Färbung von RNA-Größenstandards

RNA-Marker werden nach dem Transfer auf eine Nylonmembran mit Methylblau gefärbt. Auf diese Weise können die Markerbanden direkt mit dem Autoradiogramm eines Northern-Blots verglichen werden.

Färbelösung: 0,004% (w/v) Methylblau in 0,5 M Natrium-Acetat, pH 5,0

Die Membran mit immobilisierter RNA (siehe 2.6.16) wird 10-15 min in 5% (v/v) Essigsäure geschwenkt. Die Färbung erfolgt für 10 min in der Färbelösung. Nach dem Waschen in Wasser kann die Membran getrocknet und aufgehoben werden.

2.6.18 Northern-Hybridisierung

Der Nachweis einer bestimmten RNA durch Hybridisierung mit einer markierten Sonde wird mit dem Digoxigenin-System (DIG) von Boehringer Mannheim durchgeführt.

Durch eine *in vitro*-Transkription in Gegenwart von Digoxigenin-11-UTP wird eine strangspezifische, mit DIG gelabelte RNA als Sonde hergestellt. Im Anschluß an die Hybridisierung der RNA mit der Sonde wird die Membran mit einem Anti-DIG-Antikörper inkubiert, der mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt ist. Nach einer Chemilumineszenz-Reaktion kann das Hybridisierungssignal auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

2.6.18.1 Markierung der RNA-Sonde durch *in vitro*-Transkription

Während einer *in vitro*-Transkription wird Digoxigenin-11-UTP in die RNA eingebaut. Die *Template*-DNA muß zuvor linearisiert werden. Mit einer entsprechenden RNA-Polymerase wird der *Antisense*-Strang zur nachzuweisenden RNA in Gegenwart von Digoxigenin-11-UTP transkribiert.

Es werden folgende Plasmide als *Template* für die RNA-Sonden verwendet (siehe 7.1):

GSASH2/2	-> <i>Antisense</i> -Probe
GSATPS5/8	-> ATPase-Domänen-Probe
GSSUB9/9	-> Substraterkennungsdomänen-Probe

Als Standard-Hybridisierungsprobe in Northern-Blots wird eine Aktin-Probe hergestellt. Hierfür wird zunächst eine RT-PCR auf Gesamt-RNA von ECV-304 mit dem Primerpaar ACTU1 und ACTR1 (siehe 2.6.22) mit anschließender TA-Klonierung durchgeführt. Ein Klon, der das Aktin-Fragment von 784 bp in *Sense*-Orientierung enthält, wird für die Herstellung einer DIG-markierten RNA-Sonde verwendet.

5 µg Plasmid-DNA wird in 20 µl mit BamHI geschnitten und anschließend eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit Ethanol-fällung durchgeführt (siehe 2.6.5 und 2.6.6). Die *in vitro*-Transkription für die Aktin-Probe wird vom T7-Promotor, für die anderen drei Proben vom SP6-Promotor aus gestartet. Für die Markierung wird 1 µg der geschnittenen Plasmid-DNA eingesetzt und die Markierungsreaktion mit dem DIG RNA *labeling* Kit (Boehringer Mannheim) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt:

Reagenz	Volumen
linearisierte DNA	x µl (1 µg)
NTP <i>labeling</i> Mix	2 µl
10 x Transkriptions-Puffer	2 µl
steriles H ₂ O	auf 18 µl
SP6 oder T7 RNA-Polymerase	2 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Der Reaktionsansatz wird 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit 2 µl DNase I (10 U/µl) versetzt. Nach 15 min bei 37°C wird 0,2 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) hinzugefügt. Die RNA wird durch den Zusatz von 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl 100% Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Durch Zentrifugation mit 20 800 x g für 30 min bei 4°C wird die RNA pelletiert und mit 50 µl

2.6.18.3 Detektion

Maleinsäure-Puffer:	0,1 M Maleinsäure, pH 7,5 0,15 M NaCl
Waschpuffer:	0,3% (w/v) Tween-20 in Maleinsäure-Puffer
Block-Lösung:	1% <i>Blocking</i> Reagenz (DIG <i>Luminescent Detection</i> Kit) in Maleinsäure-Puffer
Detektionspuffer:	0,1 M Tris, pH 9,5 0,1 M NaCl

Die gewaschene Membran wird 1 min bei RT in Waschpuffer geschwenkt, in 20 ml Block-Lösung pro 100 cm² Membranfläche eingeschweißt und 60 min bei RT geschwenkt. Anschließend erfolgt die 30-minütige Inkubation im Anti-DIG-Antikörper, AP-konjugiert (DIG *Luminescent Detection* Kit), welcher 1:1000 in Block-Lösung (20 ml/100 cm²) verdünnt wurde. Die Membran wird nun 2 x 15 min bei RT in Waschpuffer und 2 min in Detektionspuffer bewegt. Das Chemilumineszenz-Substrat CSPD (DIG *Luminescent Detection* Kit) wird 1:100 in Detektionspuffer verdünnt und die Membran darin eingeschweißt (5 ml/100 cm²). Nach 15 min bei 37°C erfolgt die Exposition des Röntgenfilms (KODAK Biomax MR) bei RT. Die Entwicklung des Films wird in einem automatischen Filmentwickler (Protec M45, INTAS) durchgeführt.

2.6.19 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA wird nach der Dideoxyterminationsmethode durchgeführt. Hierfür werden zwei Protokolle eingesetzt: ein Dideoxyterminations-Protokoll unter Verwendung von ³⁵S- α -dATP und ein Zyklus-Sequenzierungs-Protokoll mit Farbstoff-markierten Terminatoren. Beide Protokolle beruhen auf der enzymatischen Synthese von DNA-Strängen, die an einem modifizierten Nukleotid abbricht [147].

Bei dem ersten Dideoxyterminations-Protokoll erfolgt die enzymatische DNA-Synthese in Gegenwart von ³⁵S- α -dATP in vier getrennten Ansätzen. Die Synthese wird mit jeweils einem Dideoxynukleosidtriphosphat (A-, G-, T- und C-Form) gestoppt. Die an der jeweiligen Base abgebrochenen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge werden in einem denaturierendem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und liefern ein Autoradiogramm, von dem die Sequenz einfach abzulesen ist. Die Zyklus-Sequenzierung arbeitet mit Dideoxynukleotiden, die mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Dies hat den Vorteil, daß die Sequenzierungsreaktion mit allen vier Terminatoren in einem Ansatz durchgeführt und auf einer Spur eines Sequenziergels aufgetrennt werden kann.

2.6.19.1 Dideoxyterminations-Sequenzierung mit markiertem dATP

Es wird das ^{32}P -Sequenzierungs-Kit von Pharmacia verwendet, welches für die Sequenzierungsreaktion die T7 DNA-Polymerase einsetzt.

‘A’ Mix-Short:	40 mM Tris, pH 7,6 50 mM NaCl 840 μM dCTP 840 μM dGTP 840 μM dTTP 93,5 μM dATP 14 μM ddATP	‘C’ Mix-Short:	40 mM Tris, pH 7,6 50 mM NaCl 840 μM dATP 840 μM dGTP 840 μM dTTP 93,5 μM dCTP 14 μM ddCTP
----------------	---	----------------	---

‘G’ Mix-Short:	40 mM Tris, pH 7,6 50 mM NaCl 840 μM dATP 840 μM dCTP 840 μM dTTP 93,5 μM dGTP 14 μM ddGTP	‘T’ Mix-Short:	40 mM Tris, pH 7,6 50 mM NaCl 840 μM dATP 840 μM dCTP 840 μM dGTP 93,5 μM dTTP 14 μM ddTTP
----------------	---	----------------	---

T7 DNA-Polymerase: in gepufferter Glycerin-Lösung (keine weitere Angabe vom Hersteller)

Enzym-Puffer: 20 mM Tris, pH 7,5
5 mM DTT
100 μg BSA/ml
5% Glycerin

Annealing-Puffer: 1 M Tris, pH 7,6
100 mM MgCl_2
160 mM DTT

Labelling Mix-dATP: 1,375 μM dCTP
1,375 μM dGTP
1,375 μM dTTP
333,5 mM NaCl

Stop-Lösung: 0,3% Bromphenolblau
0,3% Xylen Cyanol RR
10 mM EDTA, pH 7,5
97,5% deionisiertes Formamid

Denaturierung der *Template*-DNA: 1,5-2 µg DNA in 32 µl werden mit 8 µl 2 M NaOH versetzt und 10 min bei RT denaturiert. Es wird 7 µl 3 M Natrium-Acetat (pH 4,8), 4 µl steriles Wasser und 120 µl 100% Ethanol dazugegeben und 1 h bei -20°C gefällt. Die denaturierte DNA wird durch Zentrifugation (20 800 x g, 15 min, 4°C) pelletiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wird das Pellet in 10 µl H₂O aufgenommen.

Annealing: Die gelöste DNA wird mit 2 µl eines entsprechenden Primers (5 µM) und 2 µl *Annealing*-Puffer gemischt, 5 min bei 65°C, 10 min bei 37°C und 5 min bei RT inkubiert. Währenddessen werden pro Sequenzierungsreaktion vier Reaktionsgefäße vorbereitet, die mit je 2,5 µl des jeweiligen ddNTP-Mix beschickt werden.

Labelling: Dem Reaktionsansatz mit *Template* und Primer wird 3 µl *Labelling* Mix-dATP und 1 µl ³⁵S-α-dATP (10 µCi/µl, Amersham Buchler) zugesetzt. Die T7 DNA-Polymerase wird 1:2 mit Enzympuffer verdünnt, bevor hiervon 2 µl zum Ansatz gegeben werden.

Termination: Nach 5 min Reaktionszeit bei RT wird in jedes Reaktionsgefäß mit den verschiedenen ddNTP-Mix (siehe oben) 4,5 µl des Ansatzes gegeben und 5 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Zusatz von 5 µl Stop-Lösung werden die Ansätze bei -20°C eingefroren oder direkt auf ein Sequenziergel aufgetragen.

Die Gelelektrophorese der Sequenzierproben wird mit einer vertikalen Apparatur von Pharmacia durchgeführt (MacroPhor Sequenzier-System, Geldimensionen: 550 x 180 x 0,1 - 0,4 mm).

10 x TBE-Puffer:	0,9 M Tris, pH 8,0
	0,9 M Borsäure
	20 mM EDTA

Vor dem Gießen des Gels werden die Glasplatten mit *Repel*-Silane und *Bind*-Silane (Pharmacia) nach den Angaben des Herstellers vorbereitet. 42 g Harnstoff werden in 10 ml 10 x TBE-Puffer und 43 ml H₂O gelöst und mit 12 ml 40% Bis/Acrylamid (19:1, Roth) versetzt. Das Gemisch wird auf 100 ml mit H₂O aufgefüllt und filtriert (0,45 µM). Nach dem Zusatz von 200 µl 40% APS und 80 µl TEMED wird das Gel nach den Angaben von Pharmacia gegossen. Nach der Polymerisation des Gels wird ein Vorlauf in 1 x TBE als Laufpuffer für 20 min mit 1500 V durchgeführt. Die Sequenzierproben werden für 2 min auf 80°C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Die Probentaschen werden mit Laufpuffer gespült und je 2 µl der Proben aufgetragen. Nach dem Einlauf der Proben in das Gel mit 1500 V (25 min) wird die Spannung auf 2500 V erhöht. Während der Elektrophorese wird die Temperatur des Gels auf 55°C gehalten. Die Elektrophorese wird abgebrochen, wenn die Bromphenolblau-Front das Ende des Gels erreicht hat. Die mit *Repel*-Silane beschichtete Glasplatte wird abgenommen und das Gel 30 min in 10% (v/v) Essigsäure und 4 x 10 min in Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen des Gels für 2 h bei 80°C wird ein Röntgenfilm (Kodak X-omat) aufgelegt und 1-2 Tage exponiert.

2.6.19.2 Zyklus-Sequenzierung mit Fluoreszenz-markierten Terminatoren

Die Sequenzierung mit Fluoreszenz-markierten Terminatoren wird mit dem ABI PRISM *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* Kit von Perkin Elmer Cetus durchgeführt. Der Kit enthält die AmpliTaq DNA-Polymerase^{FS}, die speziell für Fluoreszenzsequenzierungen entwickelt wurde.

Terminator-Premix: Tris, pH 9,0
MgCl₂
A-Dye Terminator, C-Dye Terminator,
G-Dye Terminator, T-Dye Terminator
dITP, dATP, dCTP, dTTP
thermostabile Pyrophosphatase
AmpliTaq DNA-Polymerase^{FS}

Auftragspuffer: 20% 25 mM EDTA, pH 8,0
80% Formamid

Reagenz	Volumen
Terminator-Premix	8 µl
DNA-Template	x µl (0,5 µg)
Primer (100 µM)	1 µl
steriles H ₂ O	auf 20 µl

Der Sequenzieransatz wird in einen DNA-*Thermal Cycler* (GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer Cetus) überführt und die Reaktion mit folgendem Programm gestartet:

Schritt 1:	2 min 96°C	
Schritt 2:	15 sec 96°C, 20 sec 55°C oder 50°C, 4 min 60°C	30 Zyklen
Schritt 3:	∞ 4°C	

Nach der Amplifizierung wird die DNA durch den Zusatz von 2 µl 3 M Natrium-Acetat, pH 4,6 und 50 µl 100% Ethanol für 30 min bei -20°C gefällt. Die DNA wird pelletiert (20 800 x g, 30 min, 4°C) und mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wird getrocknet, in 3,5 µl Auftragspuffer aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert.

Die Gelelektrophorese der Sequenzierproben wird von K. Plank-Schumacher (GBF) in einem DNA-Sequencer 373A (*Applied Biosystems*) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.6.20 DNA- und RNA-Längenstandards

2.6.20.1 DNA-Marker

λ DNA/EcoRI/HindII:	21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125 bp
λ DNA/HindIII:	23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125 bp
pM2 DNA/HaeIII:	1880, 1760, 1410, 860, 845, 672, 615, 525, 333, 295, 272 bp

2.6.20.2 RNA-Marker

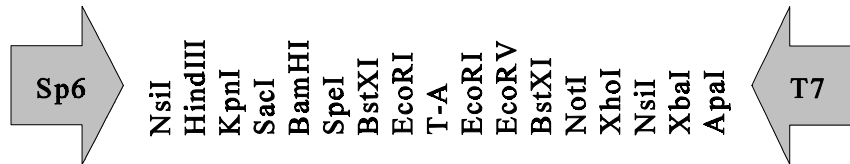
RNA <i>Molecular Weight</i> Markers (BioLabs):	4061, 2193, 1701, 1280, 754, 461 Basen
RNA-Längenstandards I, DIG-markiert (Boehringer M.):	7400, 5300, 2800, 1900, 1600, 1000, 600, 400, 300 Basen

2.6.21 Vektoren

pCRII: Dieser Vektor aus dem TA-Klonierungs-Kit von Invitrogen wird für die Klonierung von PCR-Produkten verwendet (siehe 2.6.12). Neben der Sequenzinformation für eine Ampicillinresistenz trägt pCRII ein Gen für eine Kanamycinresistenz. Durch den Besitz des lac-Promotors und eines lacZ α -Fragments ist der Vektor für ein *Blue/white-Screening* geeignet (siehe 2.4.8).

pcDNA3: pcDNA3 (Invitrogen) ist ein Vektor für die Expression von Genen in eukaryontischen Zellen unter der Kontrolle des konstitutiven CMV-Promotors. Für die Amplifikation in *E. coli* besitzt der Vektor ein Gen für eine Ampicillinresistenz. Für die Selektion in eukaryontischen Zellen ist pcDNA3 mit einem Gen für eine Neomycinresistenz ausgestattet.

(a)



(b)

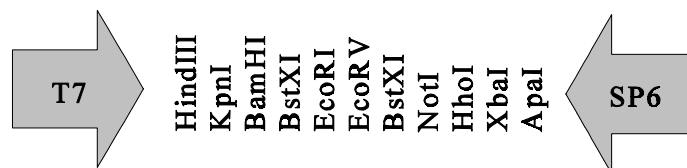


Abbildung 2: Polylinkerregionen von pCRII (a) und pcDNA3 (b).

2.6.22 Oligonukleotide

Die synthetischen Oligonukleotide werden z.T. in der Abteilung Genexpression der GBF und z.T. von der Firma GIBCO hergestellt.

Die für PCR-Reaktionen und Sequenzierungen der murinen Sequenz verwendeten Primer sind in die Nukleotidsequenz von mot-3 (siehe Abb. 23) eingefügt. Die Buchstaben U und R bezeichnen die Orientierung der Primer ('U' = *forward*, 'R' = *reverse*).

Folgende Primer werden für die TA-Klonierung der humanen Sequenz verwendet (siehe Sequenz von GR75, Abb. 59):

PBPU6:	5' [CCT CGT ACT CCT CCA TTT AT] 3'
PBPR6:	5' [CAA GTC TAT GGA TGA CTA CC] 3'

Der Primer PBPR5 fügt eine BamHI-Schnittstelle an Pos. 501 in der humanen Sequenz ein (siehe Sequenz von GR75, Abb. 59).

PBPR5:	5' [GGA TCC AAT CTG ACT CGG AGA AT] 3'
--------	--

Weitere Primer, die für Sequenzierungen von mot-3 aus den Vektoren heraus eingesetzt werden, sind:

M13 (-40) *forward* Primer: 5' [GTT TTC CCA GTC ACG AC] 3'
M13 *reverse* Primer: 5' [CAG GAA ACA GCT ATG AC] 3'
M13 (-20) *forward* Primer: 5' [GTA AAA CGA CGG CCA GT] 3'
T7-Promotor Primer: 5' [TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG] 3'
SP6-Promotor Primer: 5' [ATT TAG GTG ACA CTA TAG] 3'

Für die TA-Klonierung der cDNA von Aktin für die Herstellung einer DIG-markierten RNA-Sonde als Standard für Northern-Blots werden folgende Primer eingesetzt [48]:

ACTU1: 5' [GAC GAG GCC CAG AGC AAG CG] 3'
ACTR1: 5' [ATC TCC TTC TGC ATC CTG TC] 3'

3 Ergebnisse

3.1 Die am IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase

3.1.1 Am IL-1-Rezeptor von murinen und humanen Zelllinien ist eine durch IL-1 stimulierbare Kinase assoziiert

In Anlehnung an die von Martin et al. [105] publizierten Versuche ließ sich nach der Immunopräzipitation mit einem Antikörper gegen den IL-1-Rezeptor in EL4-6.1 (murine Thymoma-Zelllinie) und in HepG2 (humane Hepatom-Zelllinie) eine Kinaseaktivität nachweisen, deren Aktivität von einer Stimulierung der Zellen mit IL-1 abhängig war (Abb. 3).

Diese in EL4-6.1 bereits beschriebene Kinaseaktivität [105] war durch eine 10-minütige Inkubation der Zellen mit 10 ng IL-1 β /ml zu induzieren. Das IL-1RI-Immunopräzipitat aus nichtstimulierten Zellen zeigte als Grundaktivität eine schwache Phosphorylierung einer Bande bei 50 kD und des exogenen Substrates MBP (Abb. 3, Spur 2). Die Stimulierung der Zellen führte zur deutlichen Phosphorylierung einer endogenen 60 kD-Bande (Abb. 3, Spur 3).

Die Stimulierung von HepG2 mit IL-1 β führte im IL-1RI-Immunopräzipitat zur Phosphorylierung eines endogenen Substrates mit einem Molekulargewicht von 55 kD. Weiterhin wurde die Phosphorylierung des exogenen Substrates MBP durch die Stimulierung der Zellen deutlich verstärkt. Sowohl in den Immunopräzipitaten aus unstimulierten als auch aus stimulierten Zellen zeigte sich im Kinasetest eine Phosphorylierung von drei Banden zwischen 70 und 90 kD (Abb. 3, Spur 6 und 7). Die Stimulierung der humanen Endothelzelllinie ECV-304 mit IL-1 β führte zu einer allgemeinen leichten Verstärkung der Phosphorylierungsaktivität im IL-1RI-Immunopräzipitat (Abb. 3, Spur 4 und 5).

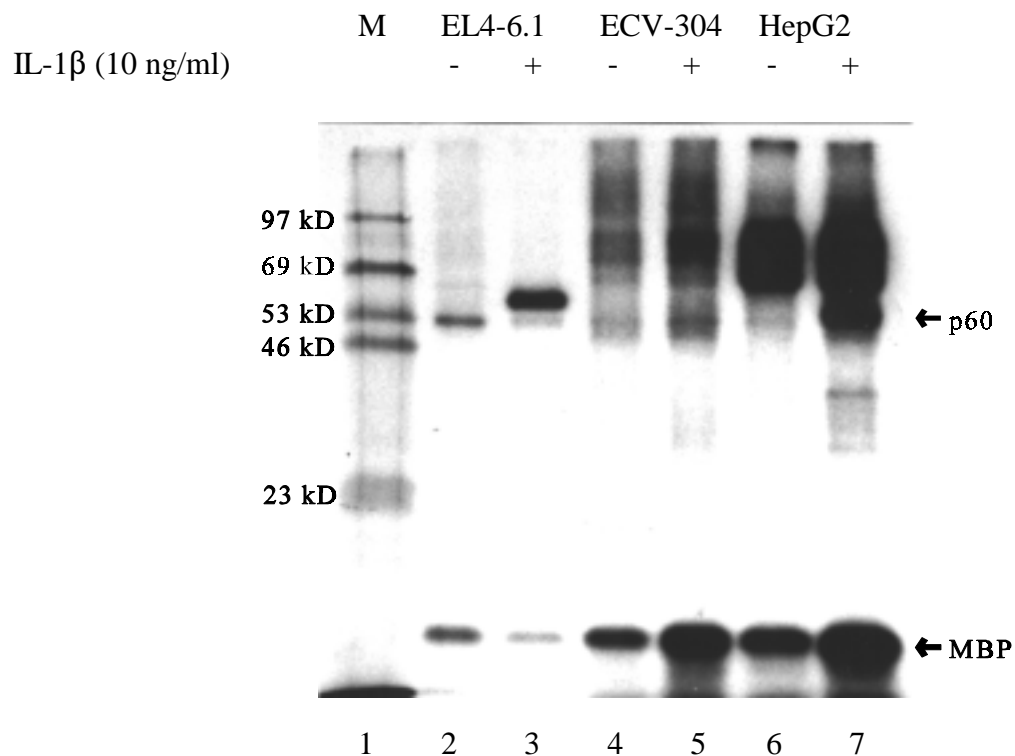


Abbildung 3: Kinaseaktivität in IL-1RI-Immunopräzipitaten verschiedener Zellen. Es wurden je 2×10^7 Zellen (EL4-6.1) bzw. 1×10^7 Zellen (ECV-304 und HepG2) mit IL-1 β (10 ng/ml) für 10 min stimuliert. Nach dem Lysieren der gewaschenen Zellen erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper gegen den IL-1-Rezeptor für 2 h bei 4°C. Die Proteine wurden mit Protein G-Sepharose präzipitiert. Für den *in vitro*-Kinasetest wurden die Immunopräzipitate mit 2 μ Ci 32 P- γ -ATP (spez. Aktivität 3000 Ci/mmol) und 2 μ g MBP in einem Volumen von 50 μ l für 10 min inkubiert. Ein Aliquot dieses Ansatzes wurde unter denaturierenden Bedingungen auf einem 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Trocknen des Gels wurde ein Autoradiogramm erstellt. Spur 1: Größenstandard, Spur 2: EL4-6.1 IP-IL-1, Spur 3: EL4-6.1 IP +IL-1, Spur 4: ECV-304 IP -IL-1, Spur 5: ECV-304 IP +IL-1, Spur 6: HepG2 IP -IL-1, Spur 7: HepG2 IP +IL-1

Die Aktivierung der am IL-1-Rezeptor assoziierten Kinase von EL4-6.1 und HepG2 konnte durch die Gegenwart des Rezeptorantagonisten IL-1ra (500 ng IL-1ra/ml) während der Stimulierung der Zellen mit IL-1 β vollständig unterbunden werden (Abb. 4).

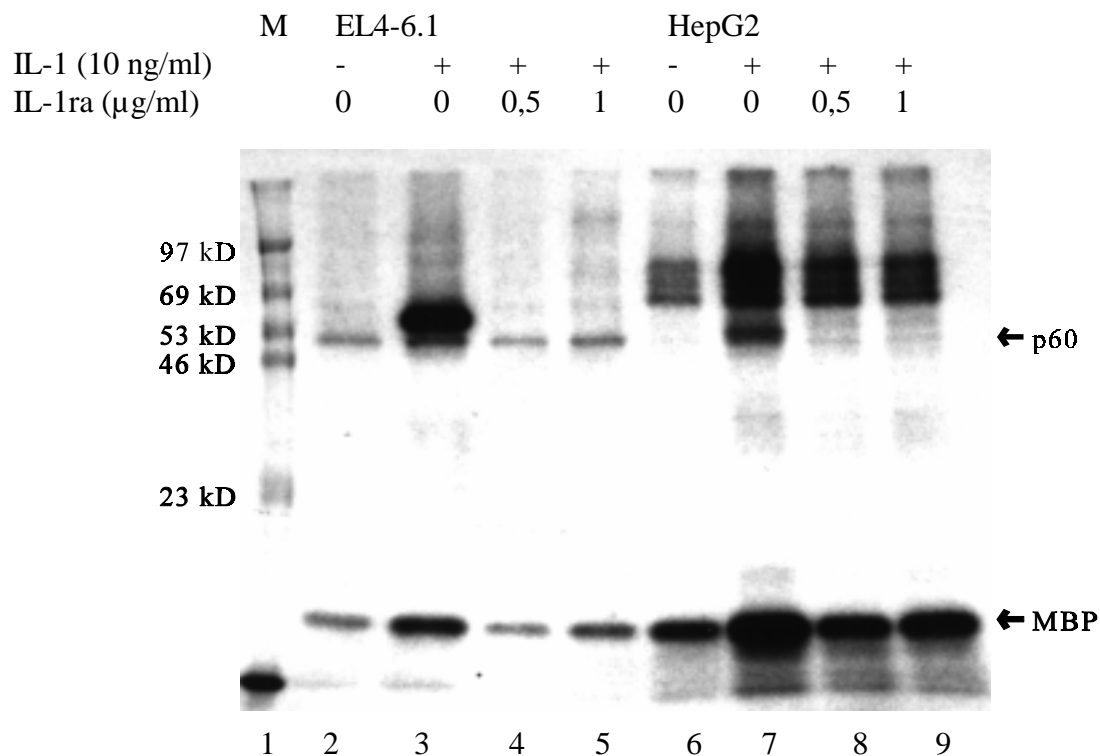


Abbildung 4: Hemmung der Kinaseaktivierung durch IL-1ra in EL4-6.1 (Spur 2-5) und HepG2 (Spur 6-9). Je 2×10^7 Zellen (EL4-6.1) bzw. 1×10^7 Zellen (HepG2) wurden mit den angegebenen Konzentrationen von IL-1 β und IL-1ra für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Immunopräzipitation und der *in vitro*-Kinasetest, wie unter Abb. 3 beschrieben, durchgeführt. Spur 1: Größenstandard, Spur 2: EL4-6.1 IP -IL-1, Spur 3: EL4-6.1 IP +IL-1, Spur 4: EL4-6.1 IP +IL-1 (0,5 µg IL-1ra/ml), Spur 5: EL4-6.1 IP +IL-1 (1 µg IL-1ra/ml), Spur 6: HepG2 IP -IL-1, Spur 7: HepG2 IP +IL-1, Spur 8: HepG2 IP +IL-1 (0,5 µg IL-1ra/ml), Spur 9: HepG2 IP +IL-1 (1 µg IL-1ra/ml)

Durch die Erhöhung der ATP-Konzentration auf 1 µM bei einer gleichbleibenden Radioaktivitätsmenge im Kinasetest (und einer damit verbundenen Erniedrigung der spezifischen Radioaktivität von 3000 Ci/mmol auf etwa 40 Ci/mmol) wurde die Phosphorylierung der exogenen Substrate MBP und H1 durch die stimulierbare Kinase wesentlich stärker sichtbar. Die Erniedrigung der spezifischen Radioaktivität bewirkte, daß im Immunopräzipitat der nichtstimulierten Zellen keine Phosphorylierung mehr beobachtet werden konnte (Abb. 34, Spur 1 und 2).

Um die am IL-1-Rezeptor assoziierte Kinaseaktivität leichter quantifizieren zu können, wurde ein Kinasetest mit Phosphocellulose-Einheiten etabliert. Nach dem Einbringen eines Aliquots des Reaktionsansatzes in die Phosphocellulose-Einheit wurde das nicht-hydrolysierte radioaktive ATP von den phosphorylierten Substraten durch zwei Waschgänge abgetrennt. Durch Szintillationszählung der Phosphocellulose-Membran im Vergleich mit der Messung eines Substratstandards wurde der Umsatz an ATP bestimmt.

Für die Messungen zur Charakterisierung der Kinase wurden Zellen (EL4-6.1) verwendet, die aus einer kontinuierlichen Fermenterkultur stammten (siehe 2.3.7). Die geernteten Zellen wurden gegebenenfalls stimuliert, gewaschen, lysiert und in Aliquots bei -80°C eingefroren. Für Immunopräzipitationen wurde eine entsprechende Menge lysierter Zellen aufgetaut und, wie unter 2.5.7 beschrieben, verarbeitet.

Die Kinaseaktivität der IL-1RI-Immunopräzipitate aus Zellen der Fermenterkultur war um etwa 30% niedriger als die Aktivität der Immunopräzipitate aus Zellen der Flaschenkultur (Abb. 5).

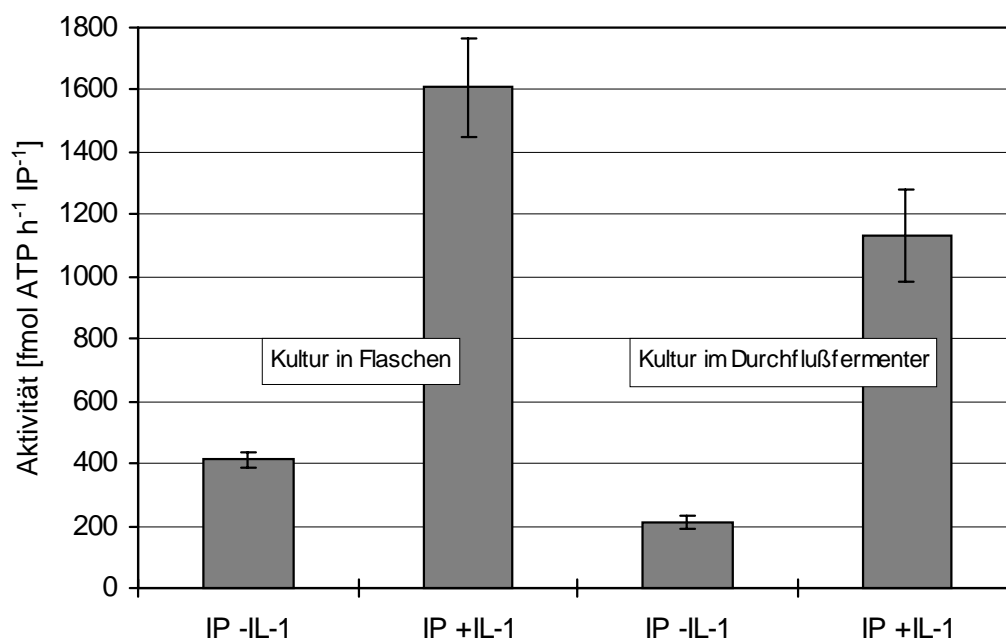


Abbildung 5: Kinaseaktivität in IL-1RI-Immunopräzipitaten aus nichtstimulierten (IP -IL-1) und aus mit IL-1 stimulierten Zellen (IP +IL-1). Es wurden jeweils 2×10^7 Zellen aus Flaschenkultur bzw. aus Fermenterkultur für die Immunopräzipitationen eingesetzt ($n = 2$).

Die Reaktionszeit im Kinasetest mit Phosphocellulose-Einheiten wurde auf 60 min festgelegt, da der Substratumsatz über mindestens 2 h linear anstieg (Abb. 6).

Die am IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase zeigte ein breites Temperaturoptimum zwischen 20 und 30°C . Oberhalb von 37°C nahm die Aktivität deutlich ab. Das Enzym wies bei einer Reaktionstemperatur von 0°C ein Drittel der maximalen Aktivität auf (Abb. 7).

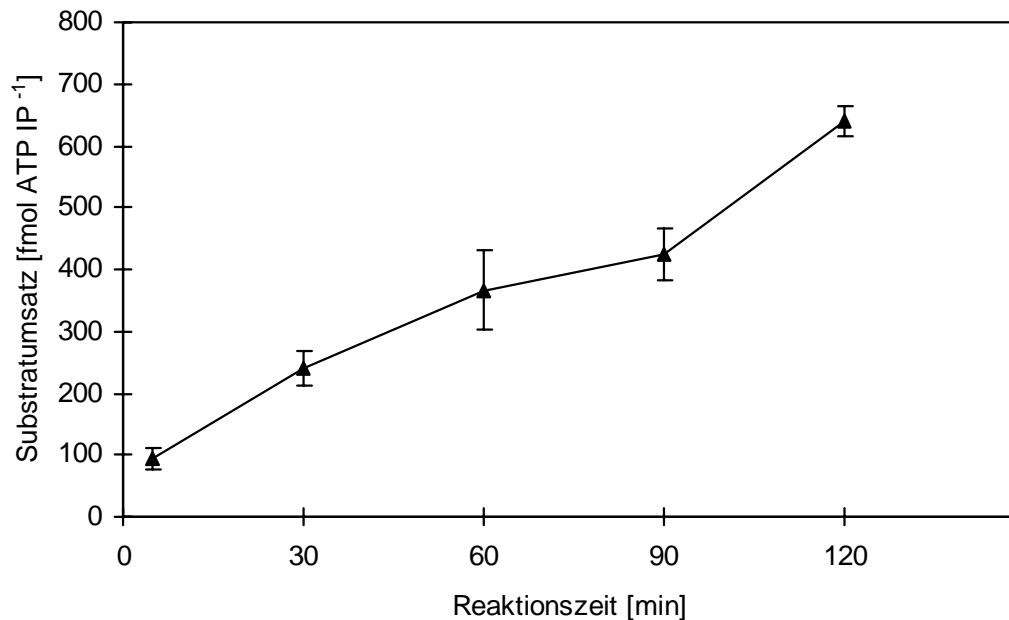


Abbildung 6: ATP-Umsatz der Kinase in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. Die IL-1RI-Immunopräzipitate aus stimulierten Zellen (EL4-6.1) wurden für die angegebenen Zeiten bei 30°C mit dem Reaktionsgemisch inkubiert und der Substratumsatz, wie unter 2.5.8.2 beschrieben, ermittelt (n = 2).

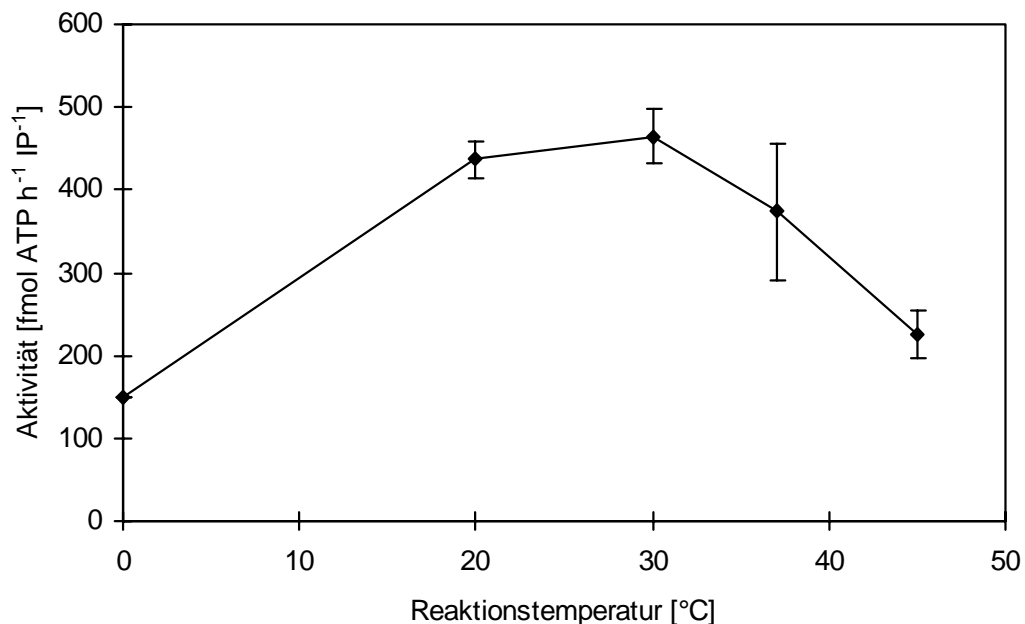


Abbildung 7: Kinaseaktivität in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur. Die enzymatische Aktivität der IL-1RI-Immunopräzipitate stimulierter Zellen wurde in 60 min Reaktionszeit bei den angegebenen Temperaturen bestimmt (n = 2).

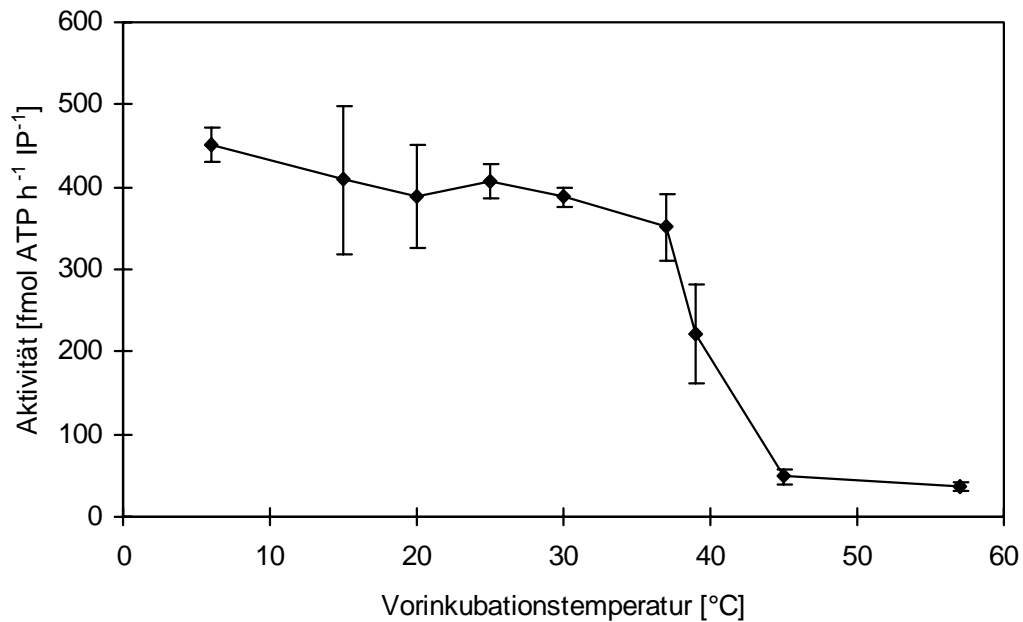


Abbildung 8: Temperaturstabilität der rezeptorassoziierten Kinase. Vor der Standard-Kinasemessung wurden die Immunopräzipitate (IP +IL-1) 1 h bei den angegebenen Temperaturen in Kinasepuffer inkubiert (n = 2).

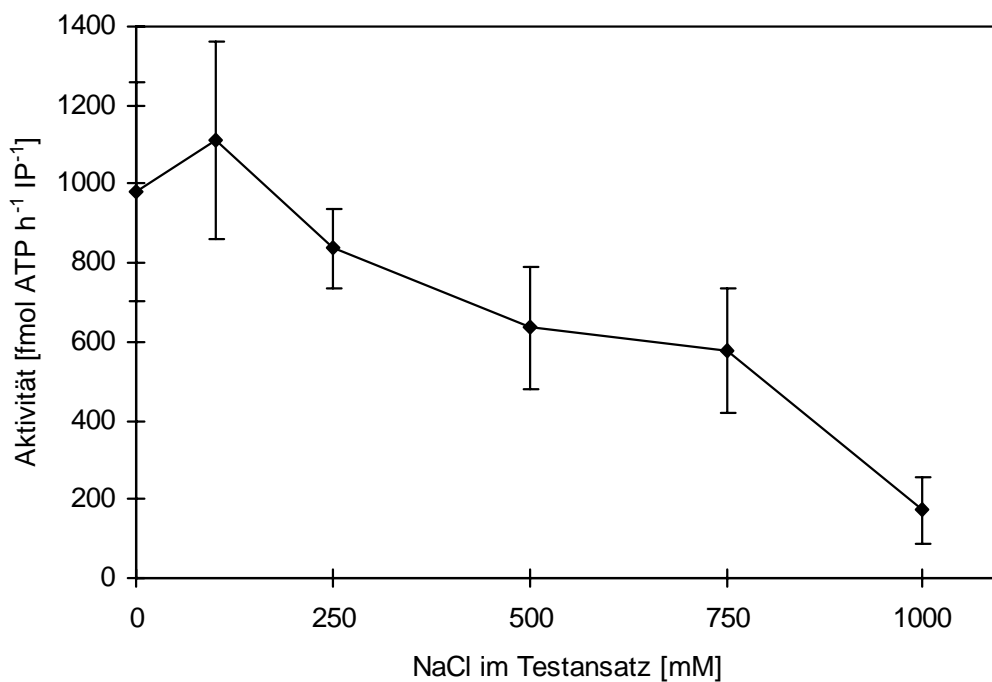


Abbildung 9: Kinaseaktivität der IL-1RI-Immunopräzipitate (IP +IL-1) in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration im Test (n = 2).

Nach einer einstündigen Vorbehandlung der IL-1RI-Immunopräzipitate bei verschiedenen Temperaturen erwies sich die Kinase bis zu einer Temperatur von 37°C als stabil. Eine Vorinkubation bei 39°C führte zu einem Aktivitätsverlust von ca. 30%. Nach einer Vorbehandlung bei Temperaturen oberhalb von 39°C war nur noch eine geringe Phosphorylierungsaktivität zu beobachten (Abb. 8).

NaCl in Konzentrationen über 100 mM hemmte die Phosphorylierungsaktivität des IL-1RI-Immunopräzipitates. 500 mM NaCl während der Kinasereaktion verminderte die Aktivität um etwa 50%. Mit einer 1 M NaCl-Konzentration im Test konnte eine Restaktivität von 15% gemessen werden (Abb. 9).

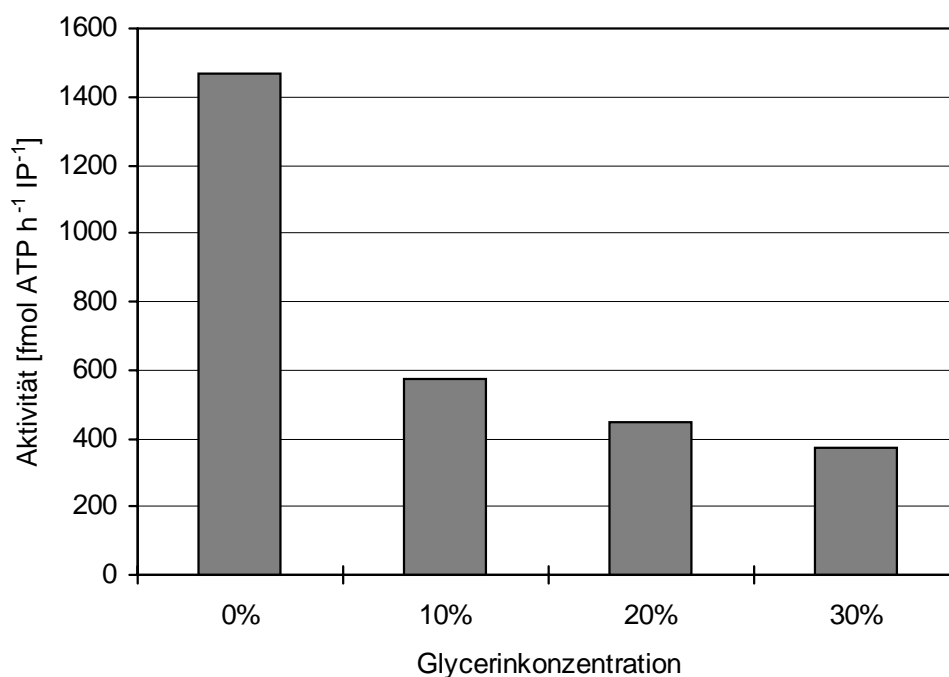


Abbildung 10: Kinaseaktivität im IL-1RI-Immunopräzipitat in Abhängigkeit von der Glycerinkonzentration im Reaktionsansatz. Die Immunopräzipitate (IP +IL-1) wurden mit 50 µl der zweifachen Glycerinkonzentration (v/v) versetzt, bevor der Standard-Kinasetest durch die Zugabe von 50 µl des radioaktiven Reaktionsgemisches gestartet wurde. Für diesen Versuch wurden Zellen aus einer Flaschenkultur verwendet (n = 1).

Durch die Gegenwart von Glycerin während der Enzymreaktion wurde die Kinaseaktivität stark beeinträchtigt. 10% Glycerin führten zu einer um etwa 60% verminderten Phosphorylierungsaktivität. Eine Erhöhung der Glycerinkonzentration auf 30% im Test reduzierte die Kinaseaktivität auf etwa 30% im Vergleich mit dem Kontrollwert (Abb. 10).

3.1.2 Das ATP-Analog Fluorosulfonylbenzoyladenosenin hemmt die Kinaseaktivität am IL-1-Rezeptor

Das ATP-Analog 5'-(4-Fluorosulfonylbenzoyl)adenosin (FSBA) ist in der Lage, über ein Sulfonylfluorid kovalent an verschiedene Aminosäuren in der ATP-Bindungsstelle von Enzymen zu binden und damit die Enzymaktivität zu beeinflussen [28]. Durch Verwendung von ^{14}C -gelabeltem FSBA ist es möglich, ein ATP-bindendes Enzym zu markieren und in einem Autoradiogramm sichtbar zu machen.

Um die optimalen Bedingungen für eine Inkubation mit dem Affinitätslabel zu finden, wurden zunächst Versuche zur Hemmung der Enzymaktivität mit nichtmarkiertem FSBA unternommen.

Für die Lösung des FSBA war es notwendig, die Inkubation des Immunopräzipitates mit dem ATP-Analog in 10% Dimethylformamid (DMF) durchzuführen. Daher wurde zuerst der Effekt dieses Lösungsmittels auf die Kinaseaktivität getestet. Eine einstündige Inkubation des Immunopräzipitates bei RT mit 10% DMF in Kinasepuffer führte zu einem Aktivitätsverlust von etwa 60% (Abb. 11).

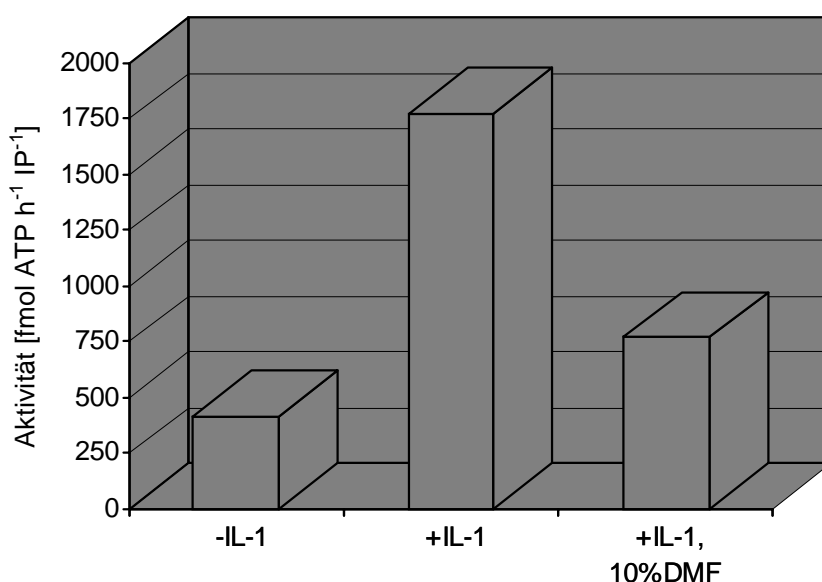


Abbildung 11: Kinaseaktivität des IL-1RI-Immunopräzipitates nach Inkubation in 10% DMF. Vor dem Standard-Kinasetest wurde das Immunopräzipitat (IP +IL-1) 1 h bei RT mit 10% DMF in Kinasepuffer (50 μl) inkubiert und anschließend zweimal mit Kinasepuffer (je 1 ml) gewaschen. Die Kontrollen wurden entsprechend mit Kinasepuffer inkubiert (n = 1).

Die Inkubation des Immunopräzipitates mit einer 200 μM FSBA-Konzentration (1 h bei RT) führte zu einem Aktivitätsverlust der rezeptorassoziierten Kinase von 60-70%. Die Kontrolle war entsprechend mit 10% DMF behandelt worden. Durch eine Erhöhung der FSBA-Konzentration auf 2 mM konnte eine maximale Hemmung auf etwa 15% Restaktivität erreicht werden. Die Anwesenheit von divalenten Kationen (Mg^{2+} und Mn^{2+}) verminderte den hemmenden Effekt. Unter diesen Bedingungen war die Kinase bis zu einer verbleibenden Aktivität von 30% zu hemmen (Abb. 12). Bei den Unterschieden bezüglich der Anwesenheit von divalenten Kationen während der Inkubation mit FSBA handelte es sich jedoch nicht um signifikante Abweichungen.

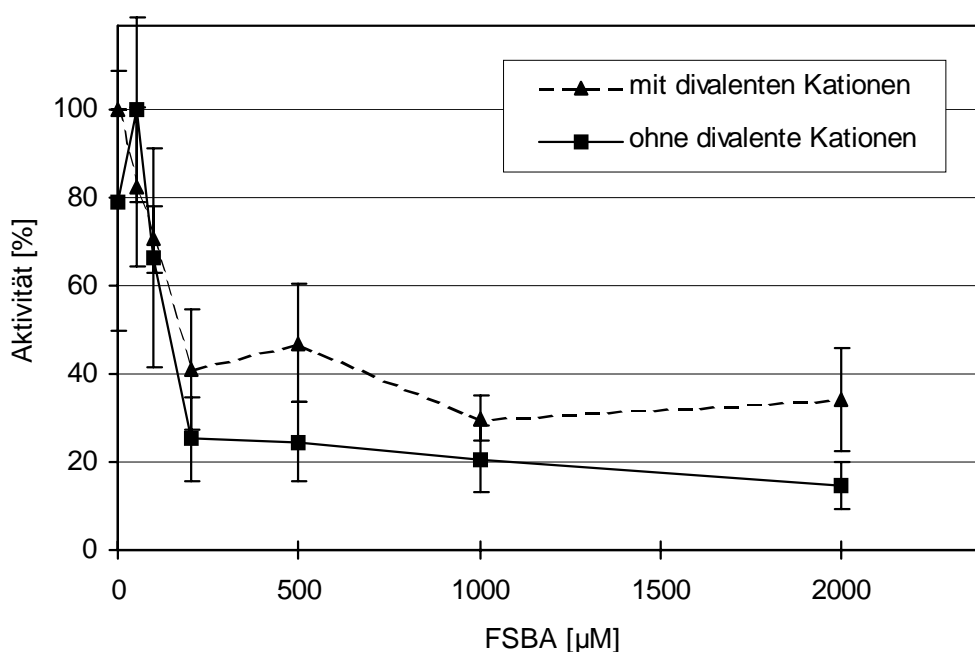


Abbildung 12: Kinaseaktivität der IL-1RI-Immunopräzipitate nach Vorinkubation mit verschiedenen FSBA-Konzentrationen. Die Immunopräzipitate aus stimulierten Zellen wurden 1 h bei RT mit den angegebenen FSBA-Konzentrationen in 10% DMF in Kinasepuffer (mit divalenten Kationen) bzw. in Inkubationspuffer (ohne divalente Kationen) in einem Volumen von 50 μl inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Kinasepuffer (je 1 ml) wurde der *in vitro*-Kinasetest durchgeführt. Die maximale Kinaseaktivität der jeweiligen Meßreihe wurde als 100% gesetzt ($n = 2$).

Die Inkubation des Immunopräzipitates in 10% DMF/Inkubationspuffer bei RT ohne Zusatz von FSBA führte zu einem kontinuierlichen Aktivitätsverlust im Zeitverlauf bis zu einer Restaktivität von etwa 50% nach fünf Stunden. Die maximale Hemmung der Kinaseaktivität mit 2 mM FSBA wurde bereits nach 60 min Inkubation erreicht (Abb. 13). Eine weitere Verminderung der Aktivität konnte weder durch längere Inkubationsdauer noch durch erneute Zugabe von FSBA beobachtet werden (Abb. 14).

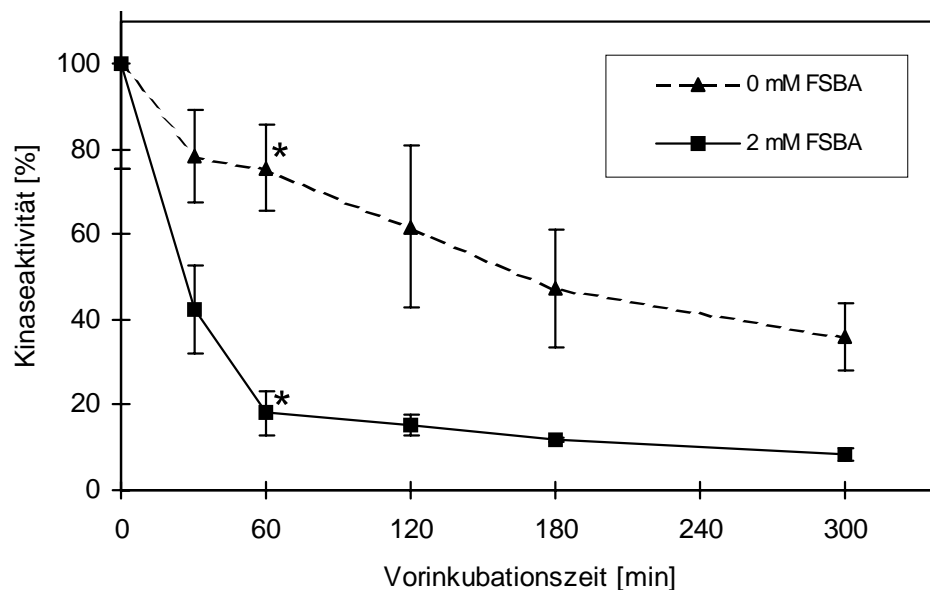


Abbildung 13: Kinaseaktivität nach Vorinkubation ohne/mit FSBA in 10% DMF. Die IL-1RI-Immunopräzipitate wurden für die angegebenen Zeiten mit 0 mM bzw. mit 2 mM FSBA bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Kinasepuffer wurde der *in vitro*-Kinasetest durchgeführt. Die Aktivität zum Zeitpunkt 0 min Vorinkubationszeit wurde als 100% gesetzt ($n = 2$). * bezeichnet einen signifikanten Unterschied der beiden Meßpunkte bei einem Signifikanzniveau von 0,02.

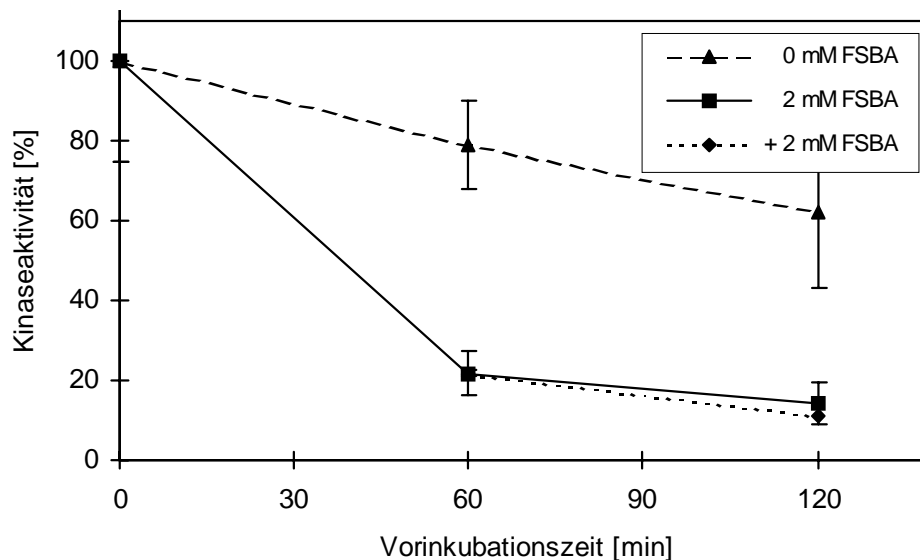


Abbildung 14: Einfluß von im Verlauf der Vorinkubation frisch zugesetztem FSBA. Die IL-1RI-Immunopräzipitate wurden 1 h mit 2 mM FSBA in einem Volumen von 50 μ l bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 5 μ l einer 20 mmolaren FSBA-Lösung wurde die Konzentration nach 1 h auf 4 mM erhöht; der Kontrolle wurde 5 μ l DMF zugesetzt. Nach zweimaligem Waschen wurde die Kinaseaktivität bestimmt ($n = 2$).

Die Phosphorylierungsaktivitäten von Immunopräzipitaten aus nichtstimulierten Zellen (IP -IL-1) nach Behandlung mit 0 mM und mit 2 mM FSBA unterschieden sich nicht voneinander. Die Restaktivität des mit 2 mM FSBA behandelten Immunopräzipitates aus stimulierten Zellen (IP +IL-1) war ca. doppelt so hoch wie die Aktivität des Immunopräzipitates aus nichtstimulierten Zellen (Abb. 15). Es war demnach ein Rest der induzierbaren Kinaseaktivität vorhanden, der nicht durch FSBA zu hemmen war.

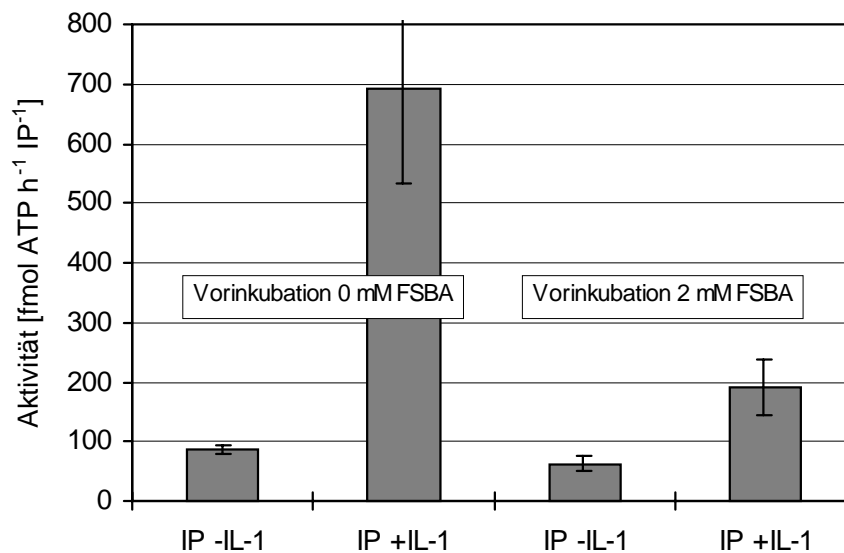


Abbildung 15: Vergleich der Kinaseaktivitäten von IL-1RI-Immunopräzipitaten (nichtstimuliert und mit IL-1 stimuliert) nach FSBA-Behandlung. Die Immunopräzipitate wurden 1 h bei RT mit 0 mM bzw. 2 mM FSBA in 10% DMF/Inkubationspuffer behandelt. Nach zweimaligem Waschen wurde die Kinaseaktivität bestimmt (n = 2).

Die Inkubation des Immunopräzipitates mit dem Affinitätslabel ¹⁴C-FSBA führte zur Markierung von zwei Proteinen mit den Molekulargewichten von etwa 25 und 45 kD. Eine schwache Markierung war bei einem Protein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 80 kD zu beobachten. Die Markierung der drei Proteine fand unabhängig vom Stimulierungsstatus der Zellen statt (Abb. 16).

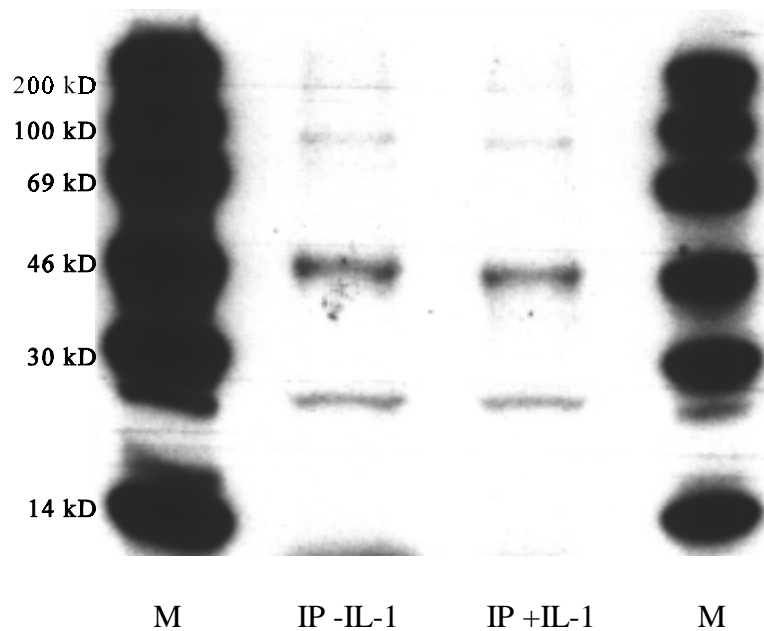


Abbildung 16: Markierung von Proteinen im IL-1RI-Immunopräzipitat mit dem ATP-Analog ^{14}C -FSBA. Immunopräzipitate von je 2×10^8 Zellen (nichtstimuliert bzw. mit IL-1 stimuliert) wurden 1 h mit einer 2 mmolaren Lösung von 5'-p-[Adenin-8- ^{14}C]-FSBA bei RT inkubiert. Pro Ansatz wurde 5 μCi an Radioaktivität eingesetzt. Die Proteine wurden in einem 10-27%igen SDS-PAGE aufgetrennt und die mit ^{14}C -markierten Proteine in einer Autoradiographie sichtbar gemacht. Vor dem Trocknen war das Gel mit EN³HANCE, wie unter 2.5.9.1 beschrieben, behandelt worden.

3.2 Das Immunpräzipitat des IL-1-Rezeptors

3.2.1 Das Immunpräzipitat besteht aus einem Komplex von Proteinen

Das IL-1RI-Immunpräzipitat zeigte neben den sehr prominenten Banden der leichten und der schweren Antikörperketten (25 und 50 kD) verschiedene weitere Proteinbanden (Abb. 17, Spur 1 und 2). Bei etwa 150 kD war eine weitere auf den Antikörper zurückzuführende Bande festzustellen, wie der Vergleich mit den Spuren 4-6 zeigt, in denen verschiedene Verdünnungen des Antikörpers aufgetrennt wurden. Auch um 40 und 90 kD tauchten leichte Verunreinigungen aus der Antikörperpräparation auf. Um 70 kD waren drei deutliche Banden zu erkennen, die nur in den Immunpräzipitaten vertreten waren. Zwischen 30 und 40 kD befanden sich einige weitere schwache Banden. Die Proteinmuster der Immunpräzipitate aus nichtstimulierten (IP -IL-1) und aus mit IL-1 stimulierten Zellen (IP +IL-1) zeigten keine deutlichen Unterschiede (Abb. 17, Spur 1 und 2).

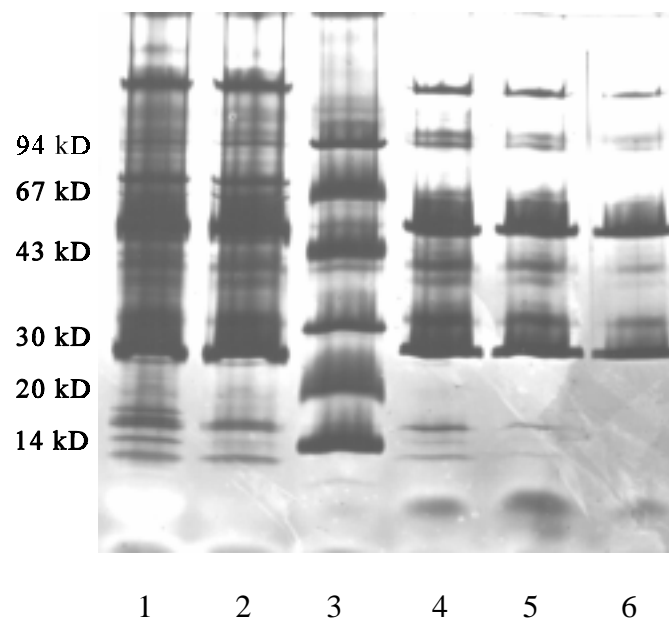


Abbildung 17: Proteine des IL-1RI-Immunpräzipitates aus EL4-6.1. 2×10^7 Zellen wurden lysiert und mit dem IL-1RI-spezifischen monoklonalen Antikörper 12A6 immunopräzipitiert. Ein Aliquot wurde unter denaturierenden Bedingungen auf einem 8-25%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit einer Silbernitrat-Färbung sichtbar gemacht. Spur 1: IP -IL-1, Spur 2: IP +IL-1, Spur 3: Proteinmarker, Spur 4: 8 ng 12A6, Spur 5: 4 ng 12A6, Spur 6: 2 ng 12A6

Um Proteine aus dem Immunopräzipitat ansequenzieren zu können, war es notwendig, die sehr prominenten Banden des Antikörpers 12A6 weitgehend aus dem Immunopräzipitat zu entfernen. Hierfür wurde die Immunopräzipitation in der Weise verändert, daß die intakten Zellen mit dem Antikörper inkubiert wurden; anschließend wurde der überschüssige Antikörper durch Waschen entfernt, bevor der Aufschluß der Zellen und die Inkubation mit der Protein G-Sepharose erfolgte. Im Vergleich mit der Kinaseaktivität des herkömmlichen Immunopräzipitates (IP-Lysat) zeigte das oben beschriebene Immunopräzipitat (IP-Zellen) eine um ca. 30% niedrigere Aktivität (Abb. 18).

Die Proteinmuster beider Immunopräzipitate unterschieden sich deutlich in den vom Antikörper 12A6 herrührenden Banden (Abb. 17 im Vergleich mit Abb. 19). Die sehr starken Banden von 25 und 50 kD im IP-Lysat (Abb. 17) waren im IP-Zellen (Abb. 19) nur noch schwach vertreten. Die Bande bei 150 kD war im IP-Zellen nicht mehr zu erkennen. Das Proteinmuster des Immunopräzipitates aus nichtstimulierten Zellen im Vergleich mit dem Immunopräzipitat aus stimulierten Zellen zeigte auch hier, wie schon bei der herkömmlichen Immunopräzipitation, keine Unterschiede (Abb. 19, Spur 1 und 2).

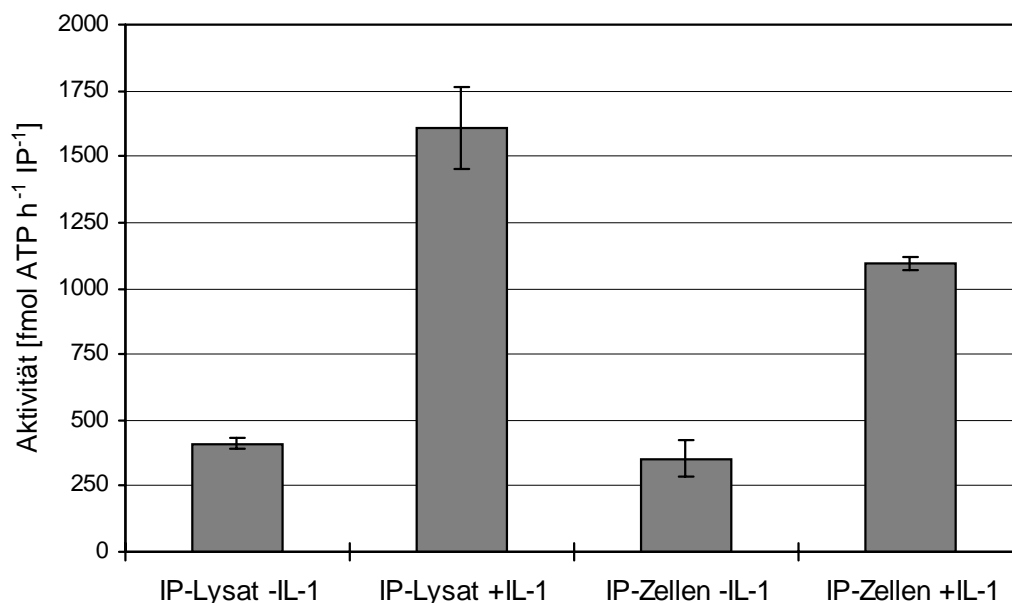


Abbildung 18: Kinaseaktivität des IL-1RI-Immunopräzipitates bei verschiedenen Methoden der Immunopräzipitation. Es wurden je 2×10^7 Zellen (nichtstimuliert bzw. 10 min mit IL-1 β stimuliert) pro Immunopräzipitation eingesetzt. IP-Lysat: Die Zellen wurden gewaschen, in 750 μ l Lysepuffer aufgeschlossen, mit 5 μ l 12A6 und anschließend mit 50 μ l Protein G-Sepharose inkubiert. Das Immunopräzipitat wurde gewaschen und der *in vitro*-Kinasetest durchgeführt. IP-Zellen: Die Zellen wurden gewaschen, in 750 μ l PBS aufgenommen, mit 5 μ l 12A6 inkubiert, mehrmals gewaschen, in Lysepuffer aufgenommen und aufgeschlossen. Nach Zugabe von 50 μ l Protein G-Sepharose erfolgte die weitere Durchführung wie bei IP-Lysat (n = 2).

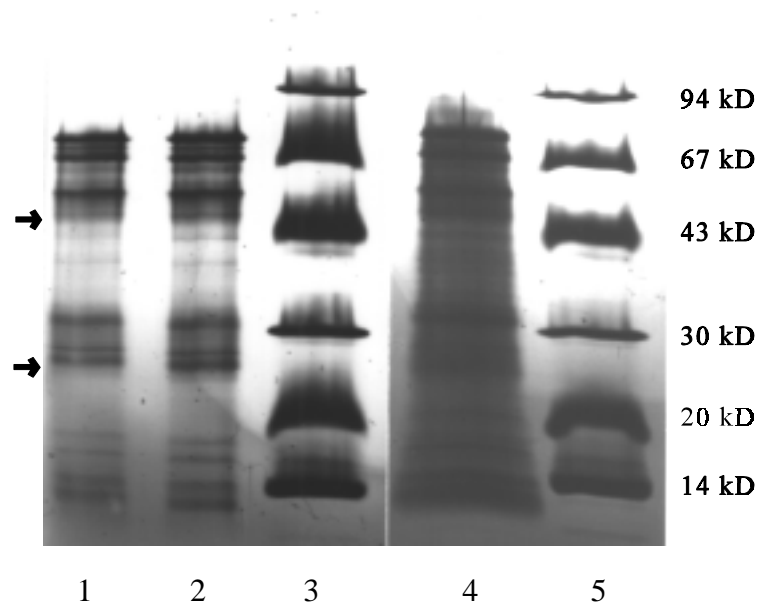


Abbildung 19: Proteinmuster des IL-1RI-Immunopräzipitates bei modifizierter Immunopräzipitationsmethode. Die Immunopräzipitation wurde, wie bei Abb. 18 unter IP-Zellen beschrieben, durchgeführt. Die Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen in einem 8-25%igen SDS-PAGE mit anschließender Silbernitrat-Färbung aufgetrennt. Zur Konzentrierung des Immunopräzipitates (Spur 4) wurde ein 65-facher Ansatz des IP-Zellen mit 3,250 ml reduzierendem Auftragspuffer ohne Glycerin versetzt, 10 min gekocht und der Überstand nach Zentrifugation abgenommen. Die Konzentrierung erfolgte über eine Membran mit einer Ausschlußgrenze von 10 kD (Centricon-10) bis zu einem Volumen von 500 μ l (siehe 2.5.7). Die Pfeile kennzeichnen die Banden des Antikörpers. Spur 1: IP-Zellen -IL-1, Spur 2: IP-Zellen +IL-1, Spur 3: Proteinmarker, Spur 4: Konzentrat des IP-Zellen, Spur 5: Proteinmarker

3.2.2 Mehrere Proteine des IL-1-Rezeptorkomplexes werden partiell sequenziert

Um sequenzierbare Proteinbanden aus dem IL-1RI-Immunopräzipitat isolieren zu können, wurde die modifizierte Immunopräzipitation (siehe 2.5.7) mit 1×10^{10} Zellen durchgeführt. Die Proteine wurden mit reduzierendem Auftragspuffer durch Kochen von der Sepharose abgelöst und über eine Membran mit einer Ausschlußgrenze von 10 kD aufkonzentriert. Die Konzentrate wurden in einem 10-27%igen SDS-PAGE aufgetrennt, mit dem Tank-Transfer-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen und die nach Coomassie-Färbung sichtbaren Banden ausgeschnitten und aminoterminal ansequenziert (siehe 2.5.12).

Es konnten acht Proteinbanden ansequenziert werden, wobei allerdings einige Aminosäurepositionen nicht eindeutig oder gar nicht zu bestimmen gewesen waren.

(Die Zahl nach "p" bezeichnet das Molekulargewicht der jeweiligen Proteinbande im Vergleich mit Größenstandards. "?" stellt Positionen dar, die nicht bestimmt werden konnten. Aminosäuren, die durch "/" getrennt sind, bezeichnen mehrere Möglichkeiten für eine Position.)

p95: Q/K M D/N/P A ? D ? N A F G/S/L Q N

p94: Q/K Y P/G Q/Y/D S/Q/G P T/N Y/Q/P S/G ? ? ? Y/G N

p74: A ? E A I K G A V V G I D L G T T N ? ?
V A V M E G ? Q A K

p70: Q/K/G/L/A G/P/N/D V/N/Y R/T/A/S D/V/L G/I T/R/Q/F
L/S/Y N/Q/T/E G/Q/Y S/N/E/D D R/P/F/D N/T/Q F G/E/D
N R G

p67: F D G K E F S G N P I K V S F A T R R A D F N M G

p50: ? V/R E/D K/A V/Y/M G Y/R ? L V/T F/A Y P/D/R/M
K/V/G ? ? N/Q ? ? F

p40: D/N Q/V G A V E Q H/R K/D A/I F T/S E A/L V/G
E V D D R

p38: G P/I/K L T D F V V N/K R D P A S K R S N
G F S F V K F

Die Proteinsequenz-Datenbanksuche (BLAST) zeigte für p38, p67 und p74 Proteine, die in hohem Maße Ähnlichkeiten zu den jeweiligen Peptidsequenzen aufwiesen.

(Die Zahlen rechts und links der Peptidsequenzen aus der Datenbank verweisen auf die Position des Peptids im Protein. Bei nicht zu bestimmenden Positionen wurde ein “?” in der Konsensus-Sequenz eingefügt. “~” in der Konsensus-Sequenz steht für eine nicht vorhandene Übereinstimmung zwischen sequenziertem Peptid und Sequenz aus der Datenbank.)

p38 zeigte mit den folgenden Proteinen eine 76%ige Übereinstimmung, d.h. 19 der 25 Aminosäuren waren identisch, wobei zwei der 25 Aminosäuren bei der Ansequenzierung nicht bestimmbar gewesen war:

- heterogenous nuclear ribonucleoprotein A2 (hnRNP A2) [*Homo sapiens*], Länge = 341 AS [17]
- heterogenous nuclear ribonucleoprotein B1 (hnRNP B1) [*Homo sapiens*], Länge = 353 AS [17]
- heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 homolog 1/2 (hnRNP A2 (A/B)) [*Xenopus laevis*], Länge = 346 AS [65]

p38:		G?LTDFVV?RDPASKRSNGFSFVKF	
Konsensus:	→	G?LTD~VV?RDPASKRS~GF~FV~F	←
hnRNP A2:	33	GTLTDCVVMRDPASKRSRGFGFVTF	57
[<i>H. sapiens</i>]			
hnRNP B1:	45	GTLTDCVVMRDPASKRSRGFGFVTF	69
[<i>H. sapiens</i>]			
hnRNP A2 (A):	33	GTLTDCVVMRDPASKRSRGFGFVTF	57
[<i>X. laevis</i>]			

Bei **p67** wiesen folgende Proteine eine 96%ige Übereinstimmung mit der Peptidsequenz auf, d.h. 24 von 25 Aminosäuren waren identisch:

- TLS/FUS [*Homo sapiens*], Länge = 525 AS [33, 139]
- fus-like protein [*Homo sapiens*], Länge = 528 AS (Accession No. U36761)
- nuclear antigen [*Bos taurus*], Länge = 512 AS [1]

p67:		FDGKEFSGNPIKVSFATRRADFNMG	
Konsensus:	→	FDGKEFSGNPIKVSFATRRADFN~G	←
FUS/TLS:	353	FDGKEFSGNPIKVSFATRRADFNRG	377
[<i>H. sapiens</i>]			
fus-like pr.:	357	FDGKEFSGNPIKVSFATRRADFNRG	381
[<i>H. sapiens</i>]			
nucl. antigen:	340	FDGKEFSGNPIKVSFATRRADFNRG	364
[<i>B. taurus</i>]			

Die aminoterminal Sequenz von **p74** und die Sequenzen von zwei tryptischen Peptiden stimmten zu 100% mit folgenden Proteinen überein:

- Mortalin [*Mus musculus*], Länge = 679 AS [166]
- PBP74 [*Mus musculus*], Länge = 679 AS [42]
- PBP74/GRP75 [*Homo sapiens*], Länge = 679 AS [42]
- CSA [*Mus musculus*], Länge = 679 AS [113]

Abb. 20 zeigt die Positionen der sequenzierten Peptide in Gegenüberstellung mit der Aminosäuresequenz von Mortalin. Insgesamt wurden 8,2% der Aminosäuresequenz von Mortalin in p74 bestimmt.

Die Sequenzen der Peptide von p74 stimmten bis auf eine Position auch mit GRP75 [*Rattus norvegicus*] überein [107]: an Position 95 enthielt GRP75 [*R. norvegicus*] ein Prolin statt eines Alanin.

p74 **A?EA**
Mort. **1** MISASRAAAA RLVGTAASRS PAAARPQDGW NGLSHEAFRF VSRRDYASEA

p74 **IKGAVVGIDL GTTN??VAVM EG?QAK TTPSV VAFTADGE**
Mort. **51** IKGAVVGIDL GTTNSCVAVM EGKQAKVLEN AEGARTTPSV VAFTADGERL

Mort. **101** VGMPAKRQAV TNPNNTFYAT KRIIGRRYDD PEVQKDTKNV PFKIVRASNG

Mort. **151** DAWVEAHGKL YSPSQIGAFV LMKMKETAEN YLGHTAKNAV ITVPAYFNDS

Mort. **201** QRQATKDAGQ ISGLNVL RVI NEPTAAALAY GLDKSEDKVI AVYDLGGGTF

Mort. **251** DISILEIQKG VFEVKSTNGD TFLGGEDFDQ ALLRHIVKEF KRETGVDLTK

Mort. **301** DNMALQRVRE AAEKAKCELS SSVQTDINLP YLTMDASGPK HLNMKLTRAQ

Mort. **351** FEGIVTDLIK RTIAPCQKAM QDAEVSKSDI GEVILVGGMT RMPKVQQTVQ

Mort. **401** DLFGRAPSKA VNPDEAVAIG AAIQGGVLAG DVTDVLLLDV TPLSLGIETL

p74 **SQ VFSTAADGQT QVEIK**
Mort. **451** GGVFTKLINR NTTIPTKKSQ VFSTAADGQT QVEIKVCQGE REMAGDNKLL

Mort. **501** GQFTLIGIPP APRGVPQIEV TFDIDANGIV HVSADKGTG REQQIVIQSS

Mort. **551** GGLSKDDIEN MVKNAEKYAE EDRRKERVE AVNMAEGIIH DTETKMEEFK

Mort. **601** DQLPADECNK LKEEISKVRA LLARKDSETG ENIRQAASSL QQASLKL FEM

Mort. **651** AYKKMASERE GSGSSGTGEQ KEDQKEEKQ*

Abbildung 20: Abgeleitete Aminosäuresequenz von Mortalin, Klon Mot-1 [166]. Oberhalb der Sequenz sind die sequenzierten Peptide von p74 aus dem IL-1RI-Immunopräzipitat angezeigt. Die Sequenz **A?EAIKGAVVGIDLGTTN??VAVMEG?QAK** wurde durch eine aminoterminal Aminosäuresequenzierung, wie in 2.5.12 beschrieben, gewonnen. Die Peptide **TTPSVVAFTADGE** und **SQVFSTAADGQTQVEIK** wurden nach proteolytischem Verdau von p74 mit Trypsin durch eine HPLC-Chromatographie isoliert und anschließend sequenziert. “?” kennzeichnet die nicht eindeutig zu bestimmenden Aminosäuren.

3.3 Das am IL-1-Rezeptor assoziierte Protein p74

3.3.1 p74 aus Mauszellen wird kloniert und sequenziert

Um die cDNA des Proteins p74 sequenzieren zu können, wurde Gesamt-RNA aus EL4-6.1 isoliert, eine RT-PCR mit Primern aus den Bereichen der sequenzierten Peptide von p74 in Anlehnung an die veröffentlichte cDNA-Sequenz von PBP74 [42] durchgeführt und das PCR-Produkt über eine TA-Klonierung in den Vektor pCRII eingeführt und amplifiziert.

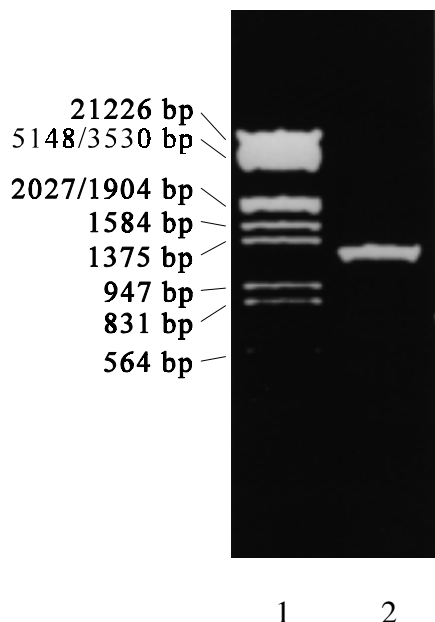


Abbildung 21: RT-PCR auf RNA von EL4-6.1 mit dem Primerpaar PBPU1 und PBPR1. Für die reverse Transkription wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt und die Reaktion, wie unter 2.6.13 beschrieben, durchgeführt. Die anschließende PCR erfolgte bei einer *Annealing*-Temperatur von 55°C. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,2%igen Agarose-Gel analysiert. Spur 1: DNA-Marker, Spur 2: RT-PCR mit dem Primerpaar PBPU1 und PBPR1

Das PCR-Produkt (1255 bp, siehe Abb. 21, Spur 2) wurde in den Vektor pCRII ligiert und in *E. coli* (Stamm INVαF') amplifiziert. Die Plasmide von verschiedenen Klonen wurden isoliert, mit EcoRI geschnitten und auf einem 1,2%igen Agarose-Gel analysiert. Zwei Klone (GSPBP16/1 und GSPBP20/1) mit der richtigen Fragmentgröße (1270 bp) wurden mit der Dideoxyterminationsmethode sequenziert (siehe 2.6.19.1). Das Insert des Klons GSPBP16/1 bestand aus Pos. 156 - Pos. 1411 der Sequenz von Mortalin/PBP74/CSA in *Antisense*-Orientierung, GSPBP20/1 wies Pos. 156 - Pos. 1411 in *Sense*-Orientierung auf (Sequenz von mot-3 in Abb. 23).

Im Vergleich mit der cDNA-Sequenz von PBP74 [42] zeigte sich in diesem Sequenzabschnitt bis auf eine Base eine vollständige Übereinstimmung mit den Klonen: an Pos. 317 wurde bei GSPBP16/1 und GSPBP20/1 ein A statt eines G sequenziert (siehe Sequenzvergleich in Abb. 59 und Tab. 1).

3.3.2 p74 ist Mortalin sehr ähnlich und wird Mot-3 genannt

Aus der bekannten Sequenz von PBP74 wurde ein Primerpaar gewählt (PBPU3 und PBPR3), dessen PCR-Produkt die translatierte Region der cDNA umschließt. Nach einer RT-PCR auf RNA von EL4-6.1 wurde das PCR-Produkt durch eine TA-Klonierung in den Vektor pCRII eingeführt und in *E. coli* (Stamm INV α F') amplifiziert. Die Plasmid-DNA von zehn Klonen wurde isoliert und analysiert. Der Verdau mit EcoRI führte bei zwei Klonen neben der DNA des Vektors (3,9 kb) zu den erwarteten Fragmenten von 1500 und 500 bp (Abb. 22, Spur 1 und Spur 4). Das 500 bp-Fragment ist in Abb. 22 nur sehr schwach zu erkennen. Das Schneiden mit EcoRV ergab für den Klon GSPBP7/2 ein Fragment von 1400 bp, für den Klon GSPBP10/2 ein Fragment von 650 bp (Abb. 22, Spur 6 und Spur 10). Demnach enthielt Klon GSPBP7/2 die gesuchte DNA in *Sense*-Orientierung und GSPBP10/2 in *Antisense*-Orientierung (vergl. Polylinkerregion von pCRII (Abb. 2) und Restriktionsschnittstellen in mot-3 (Abb. 58)).

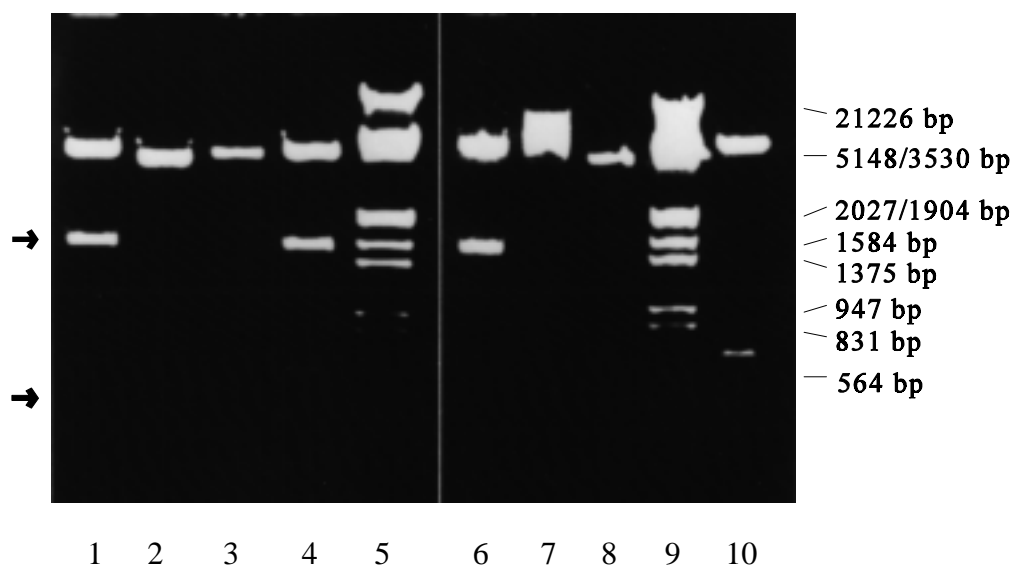


Abbildung 22: Plasmide von Klonen der TA-Klonierung der RT-PCR mit dem Primerpaar PBPU3 und PBPR3 nach Verdau mit EcoRI und EcoRV. Jeweils 1 μ g der isolierten Plasmid-DNA wurde mit 10 Units EcoRI bzw. EcoRV 1 h bei 37°C in einem Volumen von 10 μ l geschnitten. Die geschnittene DNA wurde auf einem 1%igen Agarose-Gel analysiert. Die Pfeile kennzeichnen Fragmente von 1500 und 500 bp. Spur 1: GSPBP7/2-EcoRI, Spur 2: GSPBP8/2-EcoRI, Spur 3: GSPBP9/2-EcoRI, Spur 4: GSPBP10/2-EcoRI, Spur 5: DNA-Marker, Spur 6: GSPBP7/2-EcoRV, Spur 7: GSPBP8/2-EcoRV, Spur 8: GSPBP9/2-EcoRV, Spur 9: DNA-Marker, Spur 10: GSPBP10/2-EcoRV

Das Insert des Klonen GSPBP7/2 wurde mit der *Dye Terminator Cycle Sequencing*-Methode, wie unter 2.6.19.2 beschrieben, vollständig sequenziert (Abb. 23). Im Vergleich mit den Nukleotidsequenzen von Mot-1 und Mot-2 [166, 167] und der Sequenz von PBP74 [42] zeigten sich einige Unterschiede (Tab. 1 und Sequenzvergleich in Abb. 59).

```

                                +1
      → U3 ..... ←
-14   TCTGTCCAGC CACCATGATA AGCGCCAGCA GAGCCGCGGC CGCGCGTCTC

      GTGGGCACCG CTGCGTCCCG GAGCCCCGCA GCCGCCCGTC CCCAGGATGG →.
37

      .....R7 ←
87   CTGGAATGGC CTTAGCCATG AGGCTTTTAG ATTTGTTTCA AGAAGAGATT

      → U1 ..... ←
137  ATGCATCAGA AGCAATCAAG GGTGCAGTGG TTGGTATTGA TTTGGGTACT

187  ACTAACTCCT GTGTGGCTGT TATGGAGGGC AAACAAGCAA AGGTCCTGGA

237  GAATGCTGAA GGTGCCAGAA CTACCCCTTC TGTGGTTGCC TTTACAGCAG

287  ATGGAGAACG ACTTGTTGGT ATGCCAGCAA AACGGCAAGC TGTCACCAAT

337  CCAAACAATA CCTTCTATGC TACTAAGCGT CTTATTGGAC GACGATATGA

387  TGACCCTGAA GTACAGAAAG AACTAAGAA TGTTCCTTTT AAAATTGTCC

437  GTGCCTCCAA TGGTGATGCT TGGGTTGAGG CTCATGGAAA ACTCTATTCT

487  CCAAGTCAGA TTGGAGCATT TGTGTTGATG AAGATGAAAG AGACTGCAGA

537  AAATTACTTG GGCCACACAG CAAAAAATGC TGTGATCACA GTCCCTGCTT

587  ATTTCAATGA TTCACAGCGA CAGGCCACTA AGGATGCTGG CCAGATATCT

637  GGGCTAAATG TGCTTCGAGT GATCAATGAG CCTACAGCTG CTGCTCTAGC

687  TTACGGTCTG GACAAATCTG AAGATAAAGT CATTGCTGTG TATGATTTAG

                                → U7 .....
737  GTGGTGGAAC CTTTGACATT TCTATCCTGG AAATTCAGAA AGGAGTGTTT

```

.....←
 787 GAGGTGAAAT CTACCAATGG GGACACTTTC TTAGGAGGGG AAGACTTTGA
→ U2.....
 837 CCAAGCTTTG TTGCGGCACA TTGTCAAGGA GTTCAAGAGA GAGACAGGGG
R2 ←
 887 TTGATTTGAC CAAAGACAAC ATGGCGCTTC AGAGGGTTTCG GGAAGCTGCT
 937 GAGAAGGCTA AATGTGAACT TTCCTCATCT GTGCAGACTG ACATCAACTT
 987 GCCATACCTT ACCATGGATG CTTCTGGACC AAAGCATTTG AATATGAAGC
 1037 TGACTIONGAGC TCAGTTTGAA GGCATTGTCA CAGATCTAAT CAAGAGAACT
 1087 ATTGCTCCGT GTCAGAAAGC TATGCAGGAT GCAGAAGTCA GCAAGAGTGA
 1137 CATAGGAGAA GTGATTCTGG TTGGTGCCAT GACAAGGATG CCCAAGGTTTC
 1187 AGCAGACTGT ACAAGATCTT TTTGGCAGAG CCCCAGGTAA AGCTGTTAAT
→ U8.....
 1237 CCTGATGAGG CTGTAGCCAT CGGAGCTGCC ATCCAGGGAG GTGTGTTGGC
←
 1287 TGGTGACGTT ACAGACGTGC TGCTCCTGGA TGTCACCTCC CTCTCTCTGG
 1337 GTATTGAGAC TCTGGGAGGC GTCTTTACCA AACTTATTAA TAGGAACACC
→R1 ←
 1387 ACTATTCCAA CCAAAAAGAG CCAGGTGTTT TCTACTGCTG CTGATGGACA
 1437 AACTCAAGTA GAGATTAAAG TGTGTCAGGG GGAACGAGAG ATGGCTGGAG
→ U9.....←
 1487 ACAACAACT TCTAGGACAG TTCACTTTGA TTGGAATTCC CCCAGCCCCT
 1537 CGTGGAGTGC CCCAGATTGA AGTTACATTT GACATTGATG CCAATGGGAT
 1587 TGTGCACGTT TCTGCCAAAG ATAAAGGCAC TGGTCGTGAG CAACAGATTG
 1637 TAATCCAGTC TTCTGGTGGA TTAAGCAAAG ATGATATTGA AAATATGGTT
 1687 AAAAATGCAG AGAAGTACGC TGAGGAAGAC CGCAGGAAGA AGGAACGTGT
 1737 TGAAGCAGTT AATATGGCTG AAGGAATTAT TCATGACACA GAAACCAAGA
→ U10.....
 1787 TGGAAGAATT TAAGGACCAG TTGCCTGCTG ATGAGTGCAA CAAGCTAAAG

```

      ...←
1837  GAAGAGATTT CCAAATGAG AGCGCTCCTT GCTGGAAAGG ACAGTGAGAC
1887  AGGAGAGAAC ATCAGGCAGG CAGCATCTTC CTTACAGCAG GCGTCATTGA
1937  AACTCTTCGA AATGGCGTAC AAAAAGATGG CATCTGAACG GGAAGGTTCT
      →..
1987  GGAAGTTCTG GCACTGGGGA ACAGAAGGAA GATCAGAAGG AAGAGAAACA

      .....R3 ←
2037  GTAATCGTGG CAGTGCAT

```

Abbildung 23: Nukleotidsequenz von Mot-3. Nach der TA-Klonierung mit dem Primerpaar PBP74 und PBP75 auf RNA von EL4-6.1 wurde das Insert eines entsprechenden Klonen (GSPBP7/2) sequenziert. Die für die Sequenzierung eingesetzten Primer sind in der Sequenz eingezeichnet. Um Randbereiche zu sequenzieren, wurden Primer verwendet, die mit Vektorsequenzen hybridisierten (siehe 2.6.22).

	mot-3 (GSPBP7/2)	mot-1	mot-2	PBP74
Pos. 317	a	a	a	g
Pos. 367	c*	a	a*	c
Pos. 1565	t	t	t	c
Pos. 1575	t	t	t	c
Pos. 1852	a	g	a	a
Pos. 1870	g	c	g	g
Pos. 1918	t*	c	c*	c

Tabelle 1: Unterschiede in den Nukleotidsequenzen von Klon GSPBP7/2 (TA-Klonierung des PCR-Produktes PBP74/PBP75), mot-1 und mot-2 [166, 167] sowie PBP74 [42]. Die Differenzen zwischen GSPBP7/2 und mot-2 sind durch * markiert.

	Mot-3 (GSPBP7/2)	Mot-1	Mot-2	PBP74
Pos. 106	K	K	K	R
Pos. 123	L*	I	I*	L
Pos. 522	F	F	F	S
Pos. 618	M	V	M	M
Pos. 624	G	R	G	G

Tabelle 2: Unterschiede in der abgeleiteten Aminosäuresequenz von Klon GSPBP7/2, Mot-1, Mot-2 und PBP74. Der Unterschied zwischen GSPBP7/2 und Mot-2 ist durch * gekennzeichnet.

Auf der Ebene der Nukleotidsequenz waren an sieben verschiedenen Positionen Unterschiede zwischen den verglichenen Sequenzen zu finden. Bis auf Pos. 367 und Pos. 1918 stimmte die Nukleotidsequenz des Klonen GSPBP7/2 mit der Sequenz von mot-2 überein (Tab. 1 und Abb. 59). Der Nukleotidaustausch in Pos. 1918 zog keinen Aminosäurewechsel nach sich. Die Abweichung in Pos. 367 führte zu einem Aminosäureaustausch an Pos. 123 von Isoleucin in Mot-2 zu Leucin in GSPBP7/2 (Tab. 2 und Abb. 60). Aufgrund dieser von Mot-2 abweichenden Aminosäure wurde die in dem Klon GSPBP7/2 klonierte Sequenz mot-3 genannt.

3.3.3 Mortalin wird in verschiedenen Zelllinien exprimiert

Um zu prüfen, ob Mortalin in verschiedenen Zelllinien exprimiert wird, wurde RNA aus den T-Zelllinien EL4-6.1, Jurkat E6.1 und Würzburg, aus der Endothelzelllinie ECV-304 sowie der Hepatom-Zelllinie HepG2 isoliert und eine RT-PCR mit dem Primerpaar PBPU1 und PBPR1 durchgeführt. In allen untersuchten Zelllinien war ein PCR-Produkt in der erwarteten Größe (1255 bp) festzustellen (Abb. 24).

In den Zellextrakten und IL-1RI-Immunopräzipitaten von allen untersuchten Zelllinien ließ sich Mortalin als Bande von 74 kD immunologisch nachweisen (Abb. 25). Neben der Bande von Mortalin reagierte im IL-1RI-Immunopräzipitat von ECV-304 eine Bande bei 73 kD schwach mit dem Antikörper 3a3. Hierbei handelte es sich um das konstitutiv exprimierte Hitzeschock-Protein Hsc70 (*constitutive heat shock protein*), wie unter 3.4.1 noch weiter ausgeführt wird.

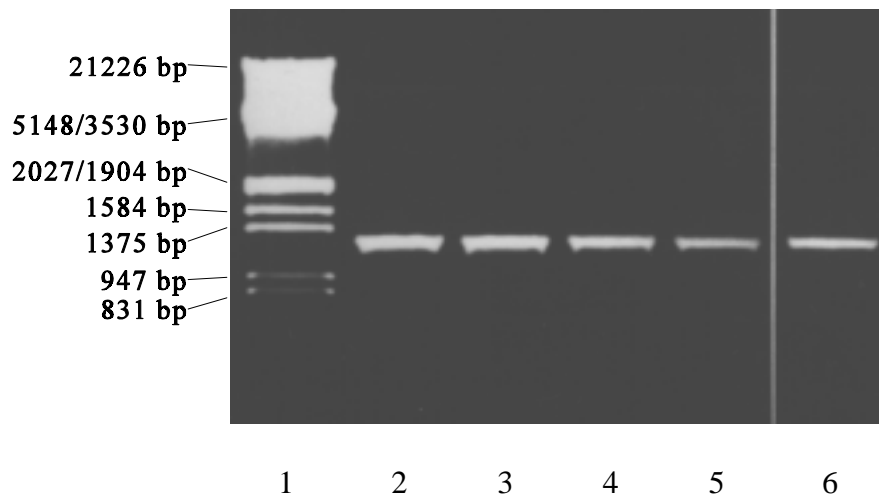


Abbildung 24: RT-PCR auf RNA von verschiedenen Zelllinien mit dem Primerpaar PBPU1 und PBPR1. Es wurde je 1 µg Gesamt-RNA für die reverse Transkription eingesetzt. Die anschließende PCR wurde bei einer *Annealing*-Temperatur von 55°C durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,2%igen Agarose-Gel analysiert. Spur 1: DNA-Marker, Spur 2: EL4-6.1, Spur 3: Jurkat E6.1, Spur 4: Würzburg, Spur 5: HepG2, Spur 6: ECV-304

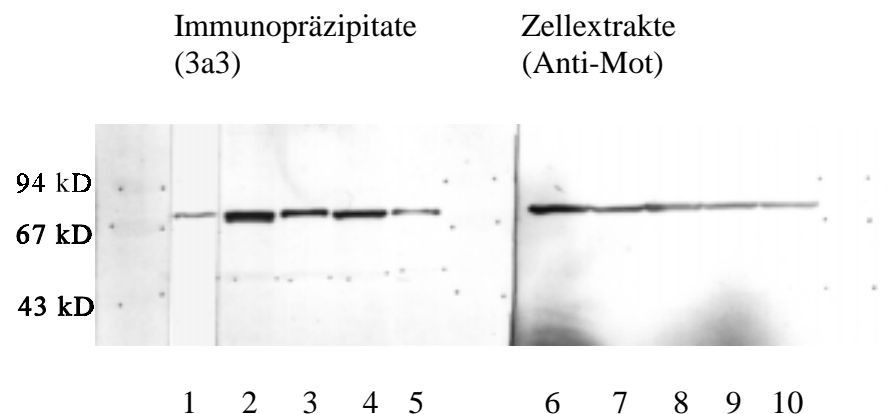


Abbildung 25: Immunologischer Nachweis von Mortalin in EL4-6.1, ECV-304, HepG2, Jurkat E6.1 und Würzburg. Die Proteine der IL-1RI-Immunopräzipitate (2×10^7 Zellen bei Suspensionszellen bzw. 1×10^7 Zellen bei adhären wachsenden Zellen) bzw. der Zellextrakte (15 µg Protein/Spur) wurden unter denaturierenden Bedingungen auf einem 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und das Protein Mortalin im Immunopräzipitat mit dem Antikörper 3a3 und im Zellextrakt mit dem Peptidantikörper Anti-Mot nachgewiesen. Spur 1: EL4-6.1 (IP), Spur 2: ECV-304 (IP), Spur 3: HepG2 (IP), Spur 4: Jurkat E6.1 (IP), Spur 5: Würzburg (IP), Spur 6: EL4-6.1 (Zellextrakt), Spur 7: ECV-304 (Zellextrakt), Spur 8: HepG2 (Zellextrakt), Spur 9: Jurkat E6.1 (Zellextrakt), Spur 10: Würzburg (Zellextrakt)

3.4 Der Antikörper gegen Mortalin

3.4.1 Zur Verfügung stehende Antikörper sind nicht spezifisch für Mortalin

Um das Protein Mortalin, welches in die Hsp70-Familie (Hitzesschock-Protein) einzuordnen ist, nachzuweisen, wurden Western-Blots mit Hsp70-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Die Antikörper BRM-22 (Sigma) und 3a3 [10] reagierten in Western-Blots der Zellextrakte von EL4-6.1 und ECV-304 mit mehreren Proteinbanden im Bereich um 70 kD (Abb. 26, Spur 1-4). Bei keiner dieser Banden handelte es sich um das induzierbare Hsp70, da die Zellextrakte mit einem für dieses Hitzeschock-Protein spezifischen Antikörper (SPA-810, StressGen) keine Reaktion zeigten. Der Antikörper 3a3 erkannte im Zellextrakt von EL4-6.1 ausschließlich Mortalin (p74); in ECV-304 wurde von diesem Antikörper Mortalin und Hsc70 (p73) in etwa gleicher Stärke detektiert (Abb. 26, Spur 3 und 4). Bhattacharyya et al. geben für diesen Antikörper eine Kreuzreaktion mit Hsp70 (induzierbar), Hsc70 (p73, konstitutiv) und PBP74/Mortalin/CSA an [10]. Da das induzierbare Hsp70 durch das negative Resultat mit SPA-810 auszuschließen ist, ist p73 eindeutig als das konstitutive Hsc70 zu identifizieren. BRM-22 detektierte im Zellextrakt von ECV-304 vier Proteinbanden (Abb. 26, Spur 2). Die Banden bei 74 kD (Mortalin) und bei 73 kD (konstitutives Hsc70) waren sehr stark vertreten. Zwei schwache Banden konnten bei etwa 70 und 76 kD festgestellt werden. Im Fall der 76 kD-Bande könnte es sich um BiP/GRP78 handeln. Allerdings wird vom Vertreiber des Antikörpers keine Kreuzreaktion mit diesem Hsp70-Familienmitglied angegeben. Die Identität der Bande von 70 kD ist nicht bekannt. Im Zellextrakt von EL4-6.1 war vorwiegend die 74 kD-Bande (Mortalin) mit BRM-22 zu detektieren. Eine schwache Reaktion war, wie in ECV-304, bei 76 kD (evtl. BiP/GRP78) zu beobachten. Weitere Hsp70-Familienmitglieder waren mit diesem Antikörper in EL4-6.1 nicht nachzuweisen (Abb. 26, Spur 1).

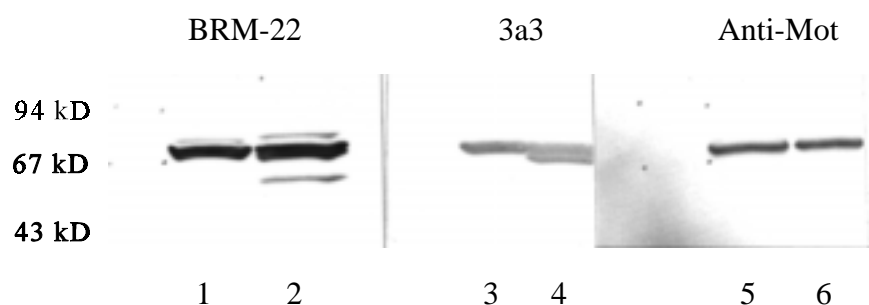


Abbildung 26: Western-Blot der Zellextrakte (EL4-6.1 und ECV-304) mit Hsp70-Antikörpern. Die Proteine der Zellextrakte (15 µg Protein pro Spur) wurden unter denaturierenden Bedingungen auf einem 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und der immunologische Nachweis mit den Antikörpern BRM-22, 3a3 und Anti-Mot, wie unter 2.5.6 beschrieben, durchgeführt. Spur 1: EL4-6.1 (BRM-22), Spur 2: ECV-304 (BRM-22), Spur 3: EL4-6.1 (3a3), Spur 4: ECV-304 (3a3), Spur 5: EL4-6.1 (Anti-Mot), Spur 6: ECV-304 (Anti-Mot)

3.4.2 Es wird ein spezifischer Antikörper gegen Mortalin produziert

Zur Produktion eines spezifischen Antikörpers gegen Mortalin (Anti-Mot) wurde ein Kaninchen mit einem Peptid immunisiert, welches aus den 14 Aminosäuren des Carboxyterminus von Mortalin bestand (Pos. 666 - Pos. 679). Der Sequenzvergleich verschiedener Mitglieder der Hsp70-Familie zeigt, daß dieser Bereich für Mortalin spezifisch ist [10]; diese Peptidsequenz ist im murinen und im humanen Protein identisch [42]. Die Synthese des Peptids, die Kopplung und die Immunisierung wurde von der Firma EUROGENTEC durchgeführt.

Im Zellextrakt von EL4-6.1 und ECV-304 konnte mit dem Serum des immunisierten Kaninchens jeweils ausschließlich eine Bande bei 74 kD nachgewiesen werden (Abb. 26, Spur 5 und 6). Eine 1:500-Verdünnung des Serums im Western-Blot war für den Nachweis von p74 ausreichend. Mit dem Präserum zeigte sich keine Reaktion.

3.4.3 Die am IL-1-Rezeptor assoziierte Kinaseaktivität läßt sich nicht durch den Antikörper gegen Mortalin isolieren

Wenn Mot-3 am IL-1-Rezeptor assoziiert ist, sollte es evtl. möglich sein, durch eine Immunopräzipitation mit dem Antikörper gegen Mortalin den IL-1-Rezeptor und die daran assoziierten Proteine und somit auch die am IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase zu isolieren. Um dies zu prüfen, wurden Zellextrakte von EL4-6.1 (nichtstimuliert und mit IL-1 β stimuliert) mit dem Anti-Mot-Serum (als Kontrolle Anti-Mot-Präserum) immunopräzipitiert. Die verbleibenden Proteine wurden mit dem Antikörper gegen den IL-1-Rezeptor immunopräzipitiert. Mit allen Immunopräzipitaten wurde der *in vitro*-Kinasetest durchgeführt. Spur 1 und 2 in Abb. 27 zeigen die Kinaseaktivitäten der standardmäßigen IL-1RI-Immunopräzipitate von nichtstimulierten und mit IL-1 stimulierten Zellen. In Spur 2 ist die Phosphorylierung von p60 durch die am IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase deutlich zu erkennen. Die Immunopräzipitationen mit Präserum und mit Anti-Mot-Serum führten im Kinasetest zur Phosphorylierung einer Vielzahl von Banden unabhängig vom Stimulierungszustand der Zellen (Abb. 27, Spur 3, 4 und Spur 7,8). Unterschiede zwischen den Immunopräzipitationen mit Präserum und mit Anti-Mot-Serum waren nicht festzustellen. Die IL-1RI-Immunopräzipitate der verbliebenen Proteine nach den Immunopräzipitationen mit Präserum (Spur 5 und 6) und Anti-Mot-Serum (Spur 9 und 10) zeigten unverändert die Phosphorylierung von p60 in den stimulierten Zellen (Spur 6 und Spur 10). Demnach ließ sich die am IL-1-Rezeptor assoziierte Kinaseaktivität nicht durch den Antikörper gegen Mortalin isolieren.

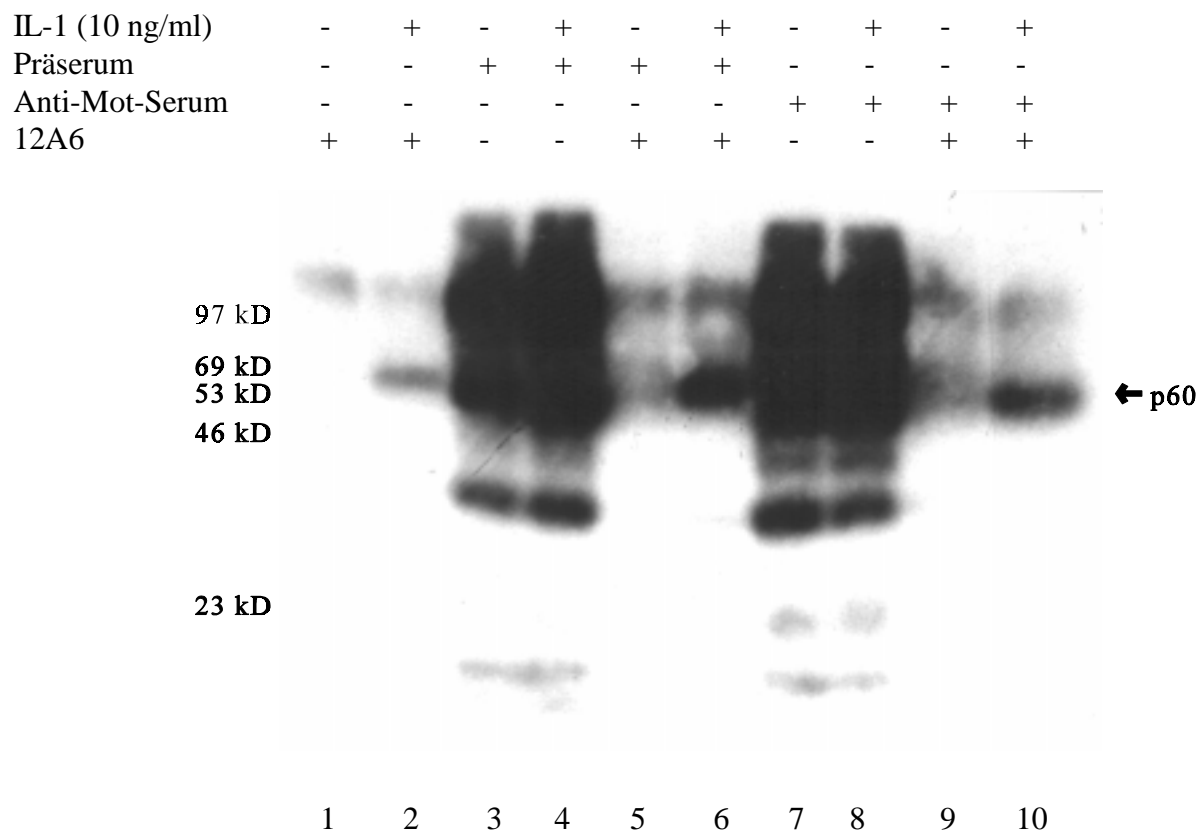


Abbildung 27: Immunopräzipitation mit dem Antikörper gegen Mortalin. Die Stimulierung von je 2×10^7 Zellen (EL4-6.1) erfolgte für 10 min mit 10 ng IL-1 β /ml bei einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml. Nach dem Aufschluß wurden die Zellen mit 2 μ l 12A6 oder mit 5 μ l Präserum bzw. Anti-Mot-Serum für 2 h bei 4°C inkubiert. Die Präzipitation erfolgte mit 50 μ l Protein G-Sepharose. Anschließend wurde der Überstand nach der Immunopräzipitation mit Präserum bzw. Serum für eine Standard-Immunopräzipitation mit dem Antikörper 12A6 verwendet. Mit allen Immunopräzipitaten wurde der *in vitro*-Kinasetest ohne den Zusatz von exogenen Substraten durchgeführt. Spur 1: IP mit 12A6 -IL-1, Spur 2: IP mit 12A6 +IL-1, Spur 3: IP mit Präserum -IL-1, Spur 4: IP mit Präserum +IL-1, Spur 5: IP mit 12A6 nach IP mit Präserum -IL-1, Spur 6: IP mit 12A6 nach IP mit Präserum +IL-1, Spur 7: IP mit Anti-Mot -IL-1, Spur 8: IP mit Anti-Mot +IL-1, Spur 9: IP mit 12A6 nach IP mit Anti-Mot -IL-1, Spur 10: IP mit 12A6 nach IP mit Anti-Mot +IL-1

3.5 Die *in vitro*-Dissoziation von Mortalin aus dem IL-1-Rezeptorkomplex

Ein genereller Wirkungsmechanismus von Proteinen der Hsp70-Familie ist die ATP-abhängige Bindung von Proteinsubstraten [134]. Um zu untersuchen, ob auch im Fall des am IL-1-Rezeptor assoziierten Mortalins Nukleotide eine Rolle spielen, wurde das IL-1RI-Immunopräzipitat mit verschiedenen Nukleotiden inkubiert, gewaschen und die verbleibenden Proteine des Immunopräzipitates auf einem SDS-Gel analysiert.

3.5.1 Durch Inkubation mit ATP dissoziiert Mortalin aus dem IL-1-Rezeptorkomplex

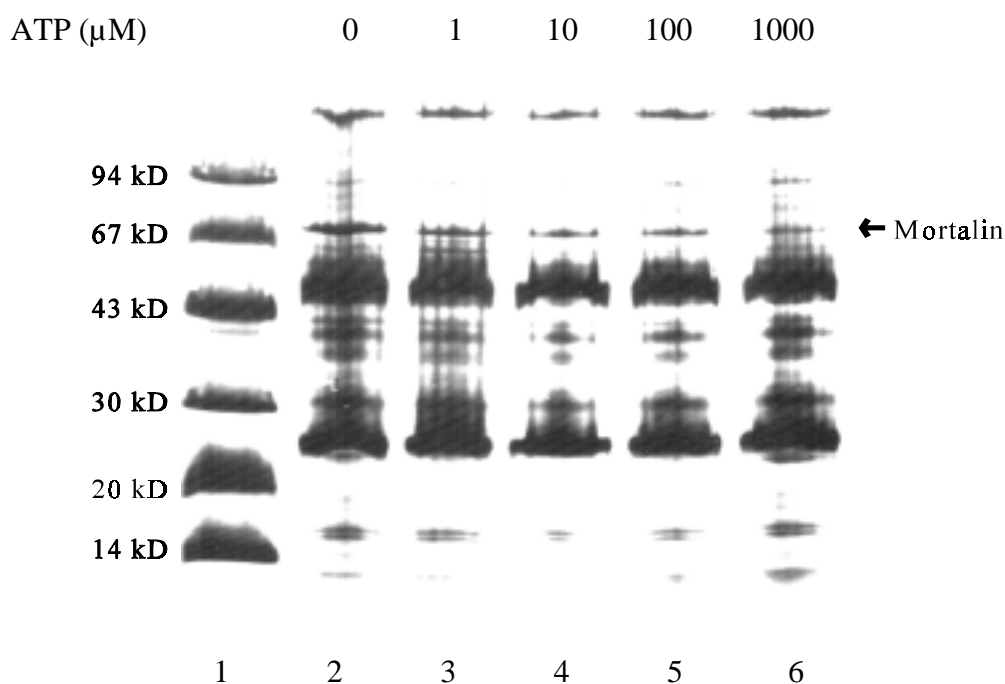


Abbildung 28: Dissoziation des Mortalin/IL-1-Rezeptorkomplexes durch ATP in Konzentrationsabhängigkeit. IL-1RI-Immunopräzipitate (IP +IL-1) wurden mit 200 μ l der jeweiligen ATP-Lösung in Kinasepuffer für 30 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Komplex zweimal mit je 1 ml Kinasepuffer gewaschen und mit 10 μ l denaturierendem Auftragspuffer versetzt. Nach dem Kochen der Probe wurde ein Aliquot auf einem 8-25%igen SDS-PAGE aufgetrennt und durch eine Silbernitrat-Färbung sichtbar gemacht. Spur 1: Protein-Marker, Spur 2: 0 μ M ATP, Spur 3: 1 μ M ATP, Spur 4: 10 μ M ATP, Spur 5: 100 μ M ATP, Spur 6: 1 mM ATP

Nach Inkubation mit einer 1 mmolaren ATP-Lösung (30 min bei 30°C) wurde die maximale Dissoziation von Mot-3 aus dem Rezeptorkomplex erreicht (Abb. 28, Spur 6). Etwa 90% von Mot-3 hatte sich aus dem Komplex gelöst. Bei Behandlung mit verschiedenen ATP-Lösungen zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit der *in vitro*-Dissoziation. Durch eine 1 μ molare ATP-Lösung löste sich ca. 10%, nach Inkubation mit 10 μ M ATP ungefähr 50% von Mot-3 aus dem Immunopräzipitat (Abb. 28).

Die *in vitro*-Dissoziation erfolgte bei Immunopräzipitaten aus stimulierten Zellen sowie bei Immunopräzipitaten aus nichtstimulierten Zellen in der gleichen Weise.

In einer zeitabhängigen Inkubation des Immunopräzipitates mit einer 1 mmolaren ATP-Lösung war nach 1 min ca. 80% von Mortalin aus dem Komplex dissoziiert. Die maximale Dissoziation von mehr als 90% war nach 10 min erreicht (Abb. 29).

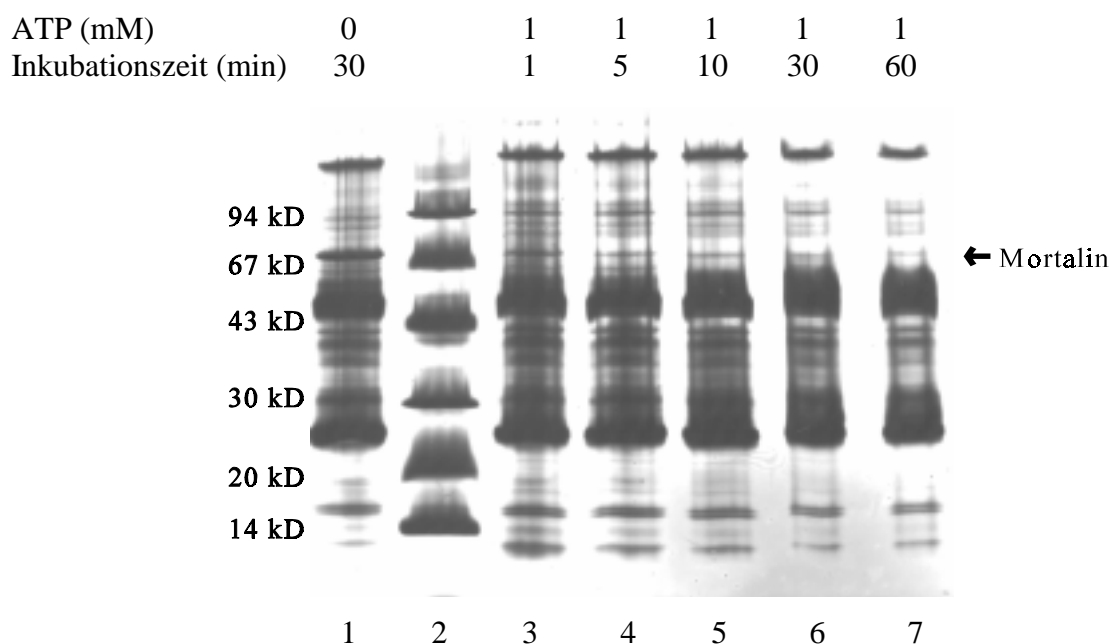


Abbildung 29: Dissoziation des Mortalin/IL-1-Rezeptorkomplexes in Zeitabhängigkeit. Die Behandlung der IL-1RI-Immunopräzipitate mit 1 mM ATP erfolgte bei 30°C für die angegebenen Zeiten. Spur 1: 0 mM ATP für 30 min, Spur 2: Protein-Marker, Spur 3: 1 mM ATP für 1 min, Spur 4: 1 mM ATP für 5 min, Spur 5: 1 mM ATP für 10 min, Spur 6: 1 mM ATP für 30 min, Spur 7: 1 mM ATP für 60 min

Die Behandlung des IL-1RI-Komplexes mit 1 mM ATP für 10 min bei verschiedenen Temperaturen zeigte eine annähernd maximale Dissoziation von Mortalin bei 0°C (auf Eis). Die Inkubation mit ATP bei höheren Temperaturen bewirkte keine deutlich gesteigerte Ablösung aus dem Komplex (Abb. 30).

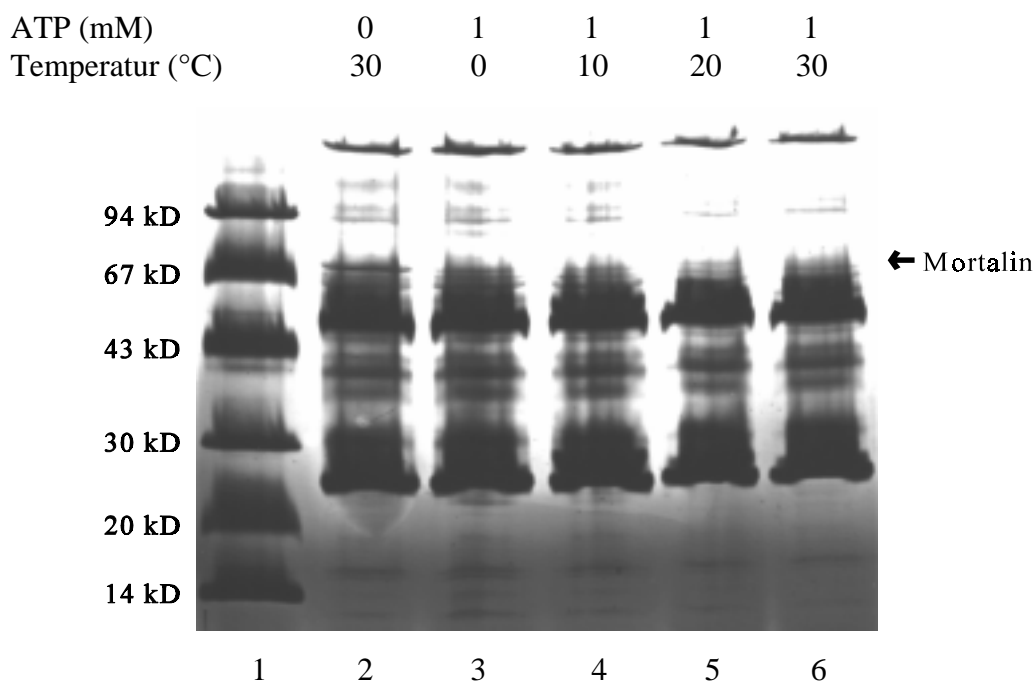


Abbildung 30: Dissoziation des Mortalin/IL-1-Rezeptorkomplexes in Temperaturabhängigkeit. Die Immunopräzipitate wurden mit 1 mM ATP für 10 min bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und anschließend zweimal mit kaltem Kinasepuffer gewaschen. Als Kontrolle wurde ein Immunopräzipitat mit 0 mM ATP für 10 min bei 30°C behandelt. Spur 1: Protein-Marker, Spur 2: 0 mM ATP bei 30°C, Spur 3: 1 mM ATP bei 0°C, Spur 4: 1 mM ATP bei 10°C, Spur 5: 1 mM ATP bei 20°C, Spur 6: 1 mM ATP bei 30°C

3.5.2 Die *in vitro*-Dissoziation ist spezifisch für ATP

Von den Nukleotiden ATP, UTP, GTP und CTP zeigte neben ATP ausschließlich GTP einen Effekt auf die Dissoziation von Mortalin. Durch Behandlung mit 1 mM GTP löste sich rund 50% aus dem Komplex. Eine Erhöhung der GTP-Konzentration auf 10 mM verstärkte den Effekt, die Wirkung von 1 mM ATP wurde jedoch nicht erreicht (Abb. 31).

Die Deoxynukleotide dTTP, dGTP und dCTP zeigten in 1 mmolaren Konzentrationen keine Wirkung auf das IL-1RI-Immunopräzipitat. Durch Behandlung mit 1 mM dATP dissoziierte ungefähr 30% von Mortalin aus dem Rezeptorkomplex (Abb. 32). Das veränderte Bandenmuster in Abb. 32, Spur 7 ist auf die Verwendung einer anderen Charge des Antikörpers 12A6 in der Immunopräzipitation zurückzuführen.

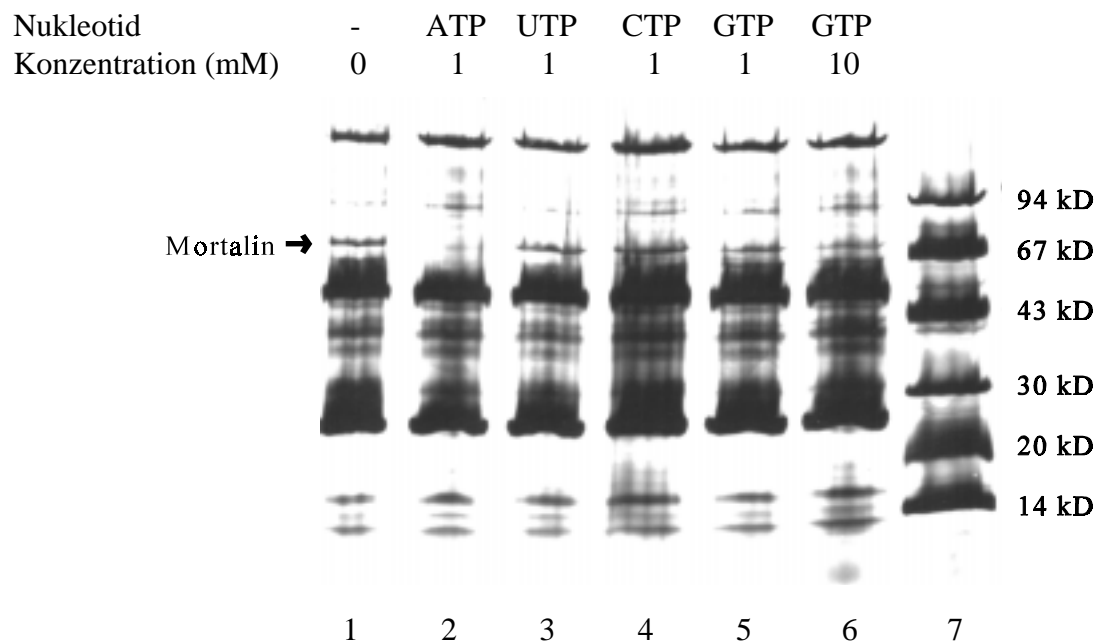


Abbildung 31: Wirkung verschiedener Nukleotide auf die *in vitro*-Dissoziation von Mortalin aus dem IL-1RI-Immunopräzipitat. Die Immunopräzipitate wurden für 30 min bei 30°C mit 1 bzw. 10 mmolaren Lösungen der angegebenen Nukleotide behandelt. Spur 1: 0 mM ATP, Spur 2: 1 mM ATP, Spur 3: 1 mM UTP, Spur 4: 1 mM CTP, Spur 5: 1 mM GTP, Spur 6: 10 mM GTP, Spur 7: Protein-Marker

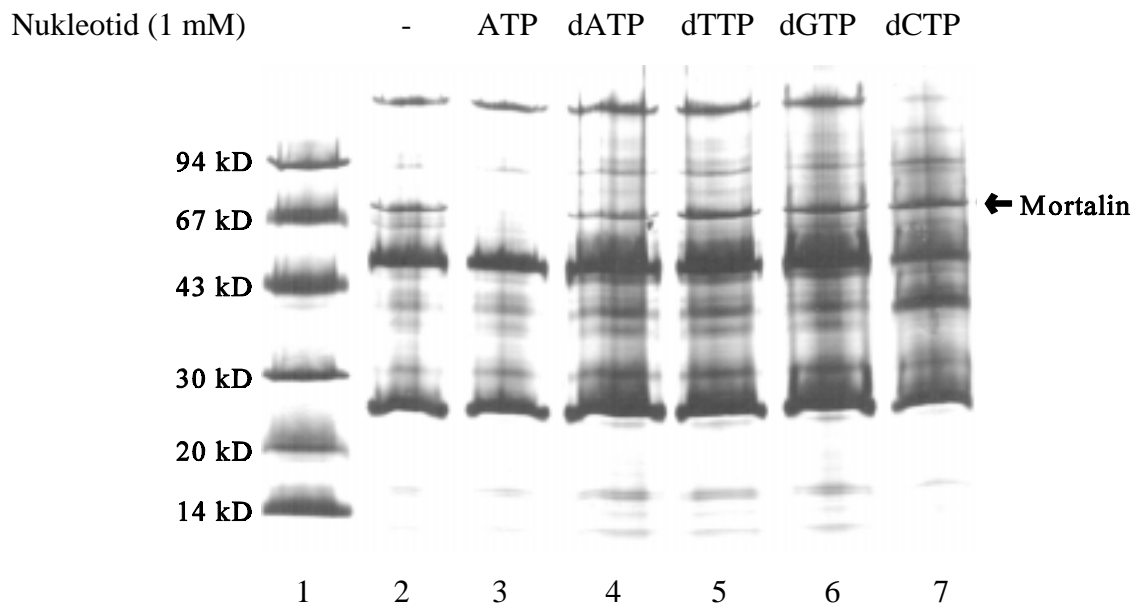


Abbildung 32: Effekt der Deoxynukleotide dATP, dTTP, dGTP und dCTP auf das IL-1RI-Immunopräzipitat. Die Proteinkomplexe wurden für 30 min bei 30°C mit 1 mmolaren Lösungen der Nukleotide inkubiert. Spur 1: Protein-Marker, Spur 2: 0 mM ATP, Spur 3: 1 mM ATP, Spur 4: 1 mM dATP, Spur 5: 1 mM dTTP, Spur 6: 1 mM dGTP, Spur 7: 1 mM dCTP

Das nicht-hydrolyisierbare ATP-Analog γ S-ATP in 1 mmolarer Konzentration führte nicht zur *in vitro*-Dissoziation von Mortalin. ADP und cAMP zeigten ebenfalls keine Wirkung. Eine äquimolare Lösung von ATP und ADP (je 1 mM) führte zu einer mehr als 90%igen Dissoziation von Mortalin aus dem Immunopräzipitat (Abb. 33).

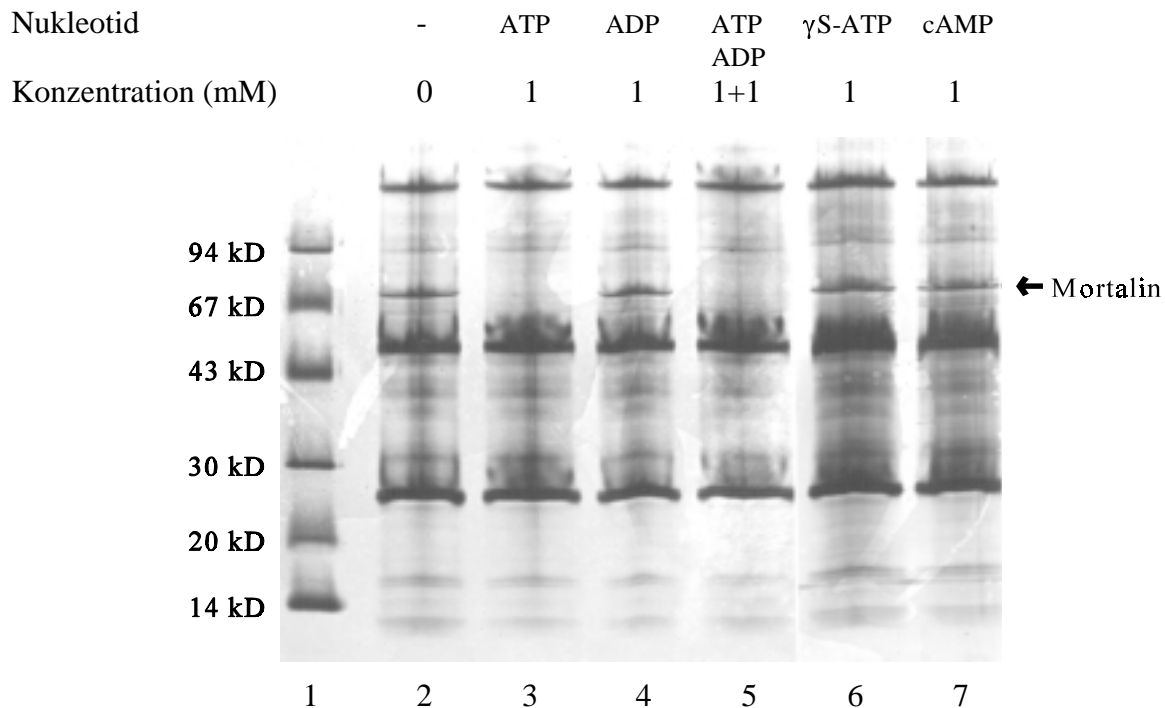


Abbildung 33: Wirkung verschiedener Adenosinnukleotide auf die *in vitro*-Dissoziation von Mortalin aus dem IL-1-Rezeptorkomplex. Die Inkubation des Immunopräzipitates mit den Nukleotidlösungen erfolgte für 30 min bei 30°C. Spur 1: Protein-Marker, Spur 2: 0 mM ATP, Spur 3: 1 mM ATP, Spur 4: 1 mM ADP, Spur 5: 1 mM ATP + 1 mM ADP, Spur 6: 1 mM γ S-ATP, Spur 7: 1 mM cAMP

3.5.3 Die *in vitro*-Dissoziation von Mortalin aus dem Rezeptorkomplex hat keinen Einfluß auf die am IL-1-Rezeptor assoziierte Kinaseaktivität

Die durch ATP verursachte Dissoziation von Mortalin aus dem IL-1RI-Immunopräzipitat hatte keinen Einfluß auf die Aktivität der stimulierbaren Kinase im IL-1-Rezeptorkomplex. Die Phosphorylierung der exogenen Substrate H1 und MBP erschien nach ausreichendem Herauswaschen des nichtradioaktiven ATP unverändert (vergl. Abb. 34, Spur 2, 4, 6 und 8). Die verminderte radioaktive Phosphorylierung des endogenen Substrates p60 ist darauf zurückzuführen, daß während der Behandlung mit ATP (10 min auf Eis) und den nachfolgenden Waschgängen das endogene 60 kD-Protein schon zum Teil phosphoryliert wurde, so daß während der Inkubation mit dem radioaktiven ATP im eigentlichen Kinasetest weniger

endogenes Substrat zur Phosphorylierung zur Verfügung stand. Spur 9 in Abb. 34 zeigt die Phosphorylierung des endogenen Substrates p60 nach Inkubation mit ^{32}P -ATP für 10 min auf Eis mit zwei nachfolgenden Waschschritten. Die spezifische Radioaktivität des ATP in den Spuren 1-8 und 9-10 ist nicht direkt zu vergleichen.

IL-1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ATP-Ink.(mM)	-	-	0,1	1	0,1	1	0,1	1	-	-
Waschen	1x	1x	1x	1x	2x	2x	4x	4x	2x	2x
Kinastest	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

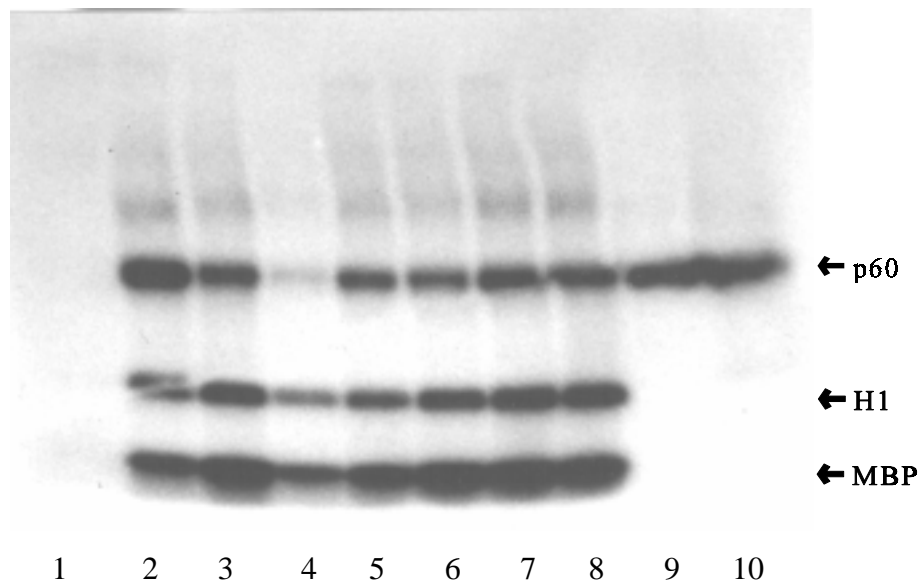


Abbildung 34: Einfluß der Dissoziation von Mortalin aus dem IL-1-Rezeptorkomplex auf die assoziierte Kinaseaktivität. Spur 1-8: Die Immunopräzipitate wurden 10 min auf Eis mit einer 0, 0,1 bzw. 1 mM ATP-Lösung inkubiert. Anschließend wurde 1-4 mal mit 1 ml Kinasepuffer gewaschen und der Standard-Kinasetest in Gegenwart von ^{32}P - γ -ATP, 1 μM nichtradioaktivem ATP und den exogenen Substraten MBP und H1 durchgeführt. Spur 9-10: Als eine Kontrolle wurde das Immunopräzipitat 10 min auf Eis bzw. bei 30°C mit einer 1 μM olaren Lösung von ^{32}P - γ -ATP inkubiert, zweimal gewaschen und auf einem SDS-PAGE wie bei dem Standard-Kinasetest aufgetrennt. Spur 1: IP -IL-1 (0 mM ATP, 10 min auf Eis, einmal gewaschen), Spur 2: IP +IL-1 (0 mM ATP, 10 min auf Eis, einmal gewaschen), Spur 3: IP +IL-1 (0,1 mM ATP, 10 min auf Eis, einmal gewaschen), Spur 4: IP +IL-1 (1 mM ATP, 10 min auf Eis, einmal gewaschen), Spur 5: IP +IL-1 (0,1 mM ATP, 10 min auf Eis, zweimal gewaschen), Spur 6: IP +IL-1 (1 mM ATP, 10 min auf Eis, zweimal gewaschen), Spur 7: IP +IL-1 (0,1 mM ATP, 10 min auf Eis, viermal gewaschen), Spur 8: IP +IL-1 (1 mM ATP, 10 min auf Eis, viermal gewaschen), Spur 9: IP +IL-1 mit 1 μM ^{32}P - γ -ATP für 10 min auf Eis, anschließend zweimal gewaschen, Spur 10: IP +IL-1 mit 1 μM ^{32}P - γ -ATP für 10 min bei 30°C, anschließend zweimal gewaschen

3.6 Der *Sense/Antisense*-Ansatz

Um die Expression von Mortalin in der Zelle zu vermindern, wurde ein *Sense/Antisense*-Ansatz gewählt. Diese Methode beruht darauf, daß ein Teil der cDNA in *Antisense*-Orientierung in die Zelle eingebracht wird, so daß die für das Zielprotein codierende mRNA mit der eingeführten *Antisense*-RNA interagiert und die Translation negativ beeinflußt wird [104].

3.6.1 Die Transfektionsversuche mit EL4-6.1

Um optimale Bedingungen für eine Transfektion von EL4-6.1 zu finden, wurde das Plasmid CMV/ β -Gal verwendet, welches das Gen für eine β -Galaktosidase unter der Kontrolle des CMV-Promotors trägt (freundlicherweise von R. Streicher, DIfE, Potsdam-Rehbrücke, zur Verfügung gestellt). Um die Effizienz der Transfektion abschätzen zu können, wurde 24 h nach der Transfektion eine Galaktosidase-Färbung der Zellen durchgeführt. Durch eine Elektroporation konnte EL4-6.1 transient transfiziert werden. Bei einer Spannung von 300 V und einer Kapazität von 975 μ F (1×10^7 Zellen, 20 μ g DNA) zeigte eine von ca. 2000 Zellen die Grünfärbung nach der Galaktosidase-Färbung (Abb. 35).

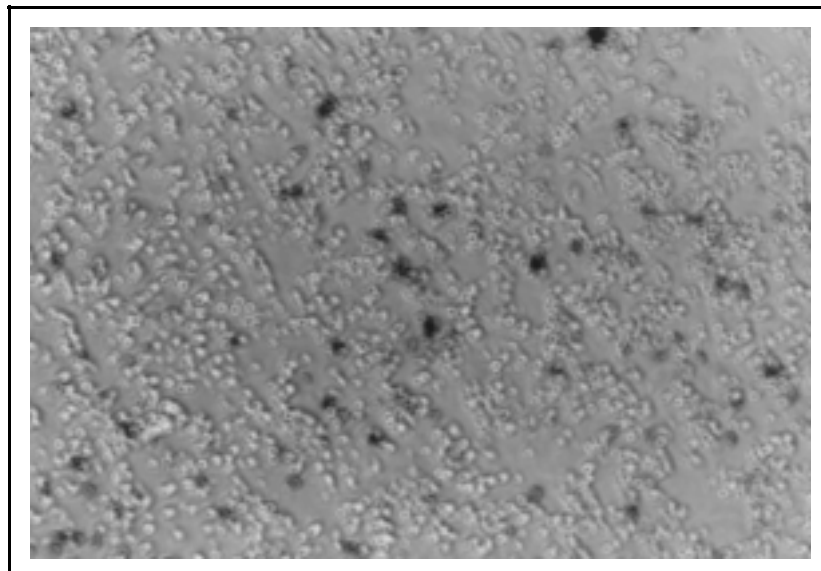


Abbildung 35: β -Galaktosidase-Färbung von EL4-6.1 nach Transfektion mit CMV/ β -Gal. 1×10^7 Zellen wurden mit 20 μ g Plasmid-DNA durch eine Elektroporation (300 V bei 975 μ F) in 400 μ l serumfreiem RPMI1640 transfiziert. 24 h später wurde eine Galaktosidase-Färbung der Zellen, wie unter 2.3.12.2 beschrieben, durchgeführt. Vergrößerung: 200x

Trotz vielfacher Versuche konnten nach der Elektroporation mit dem Vektor pcDNA3, welcher das Gen für eine Neomycinresistenz trägt, keine Klone selektioniert werden, die die Antibiotikaresistenz stabil exprimierten. Bei einer anderen Suspensionszelllinie (Jurkat E6.1), die ähnlich geringe Transfektionsraten zeigte (Abb. 36), war es im Gegensatz zu EL4-6.1 möglich, stabil transfizierte Klone zu selektionieren.

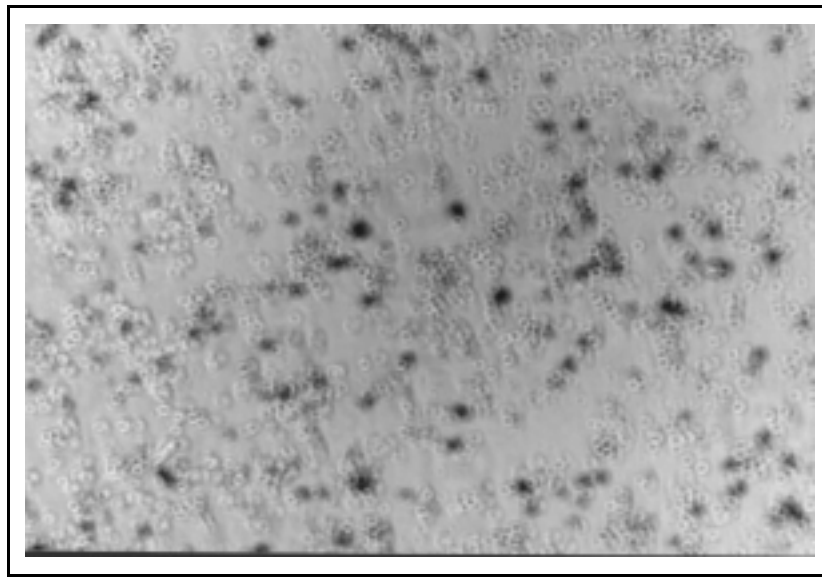


Abbildung 36: Transiente Expression der β -Galaktosidase nach Elektroporation mit CMV/ β -Gal in Jurkat E6.1. Die β -Galaktosidase-Färbung der Zellen wurde 24 h nach der Elektroporation durchgeführt (1×10^7 Zellen, 20 μ g Plasmid-DNA, 300 V, 975 μ F). Vergrößerung: 200x

3.6.2 Die durch IL-1 induzierbare Expression von Adhäsionsmolekülen als *Read out*-System für die humane Endothelzelllinie ECV-304

Als Modellsystem für Transfektionsversuche zum IL-1-Signaltransfer wurde die humane Endothelzelllinie ECV-304 gewählt. Diese Zelllinie reagiert auf die Behandlung mit IL-1 β mit der Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (B. Friedrichs, persönliche Mitteilung). Die Stimulierung dieser Zellen über 24 h mit verschiedenen Konzentrationen des Zytokins zeigte eine maximale Expression von ICAM-1 nach Behandlung mit 0,01-10 ng IL-1/ml. Die Stimulierung mit 100 ng IL-1/ml führte zu einer signifikant niedrigeren ICAM-Expression von etwa 90% der maximalen Expression. Zellen im unstimulierten Zustand wiesen eine Grundexpression von ICAM-1 auf; die Aktivierung der Zellen durch IL-1 (0,01-10 ng/ml) führte zu einer Verstärkung der ICAM-Expression um den Faktor 5-6 (Abb. 37).

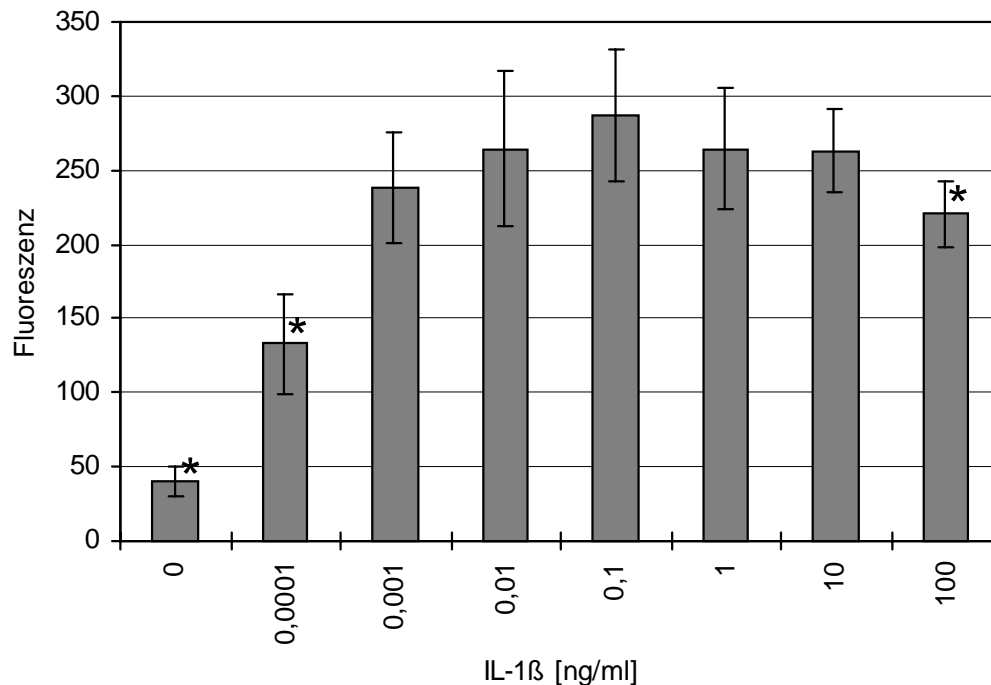


Abbildung 37: Expression von ICAM-1 in ECV-304 nach Stimulierung mit IL-1 β . Die Zellen wurden über 24 h mit den angegebenen IL-1-Konzentrationen in Wachstumsmedium behandelt. Nach Fixierung der Zellen erfolgte die Inkubation mit einem Antikörper gegen ICAM-1 und anschließend mit einem Fluoreszenz-markierten Antikörper gegen den ersten Antikörper. Die Fluoreszenz wurde bei 530/590 nm (*gain* 70) gemessen. Für jeden Wert wurden sechs parallele Messungen durchgeführt. * bezeichnet die signifikante Abweichung (Signifikanzniveau von 0,02) von der maximalen ICAM-Expression.

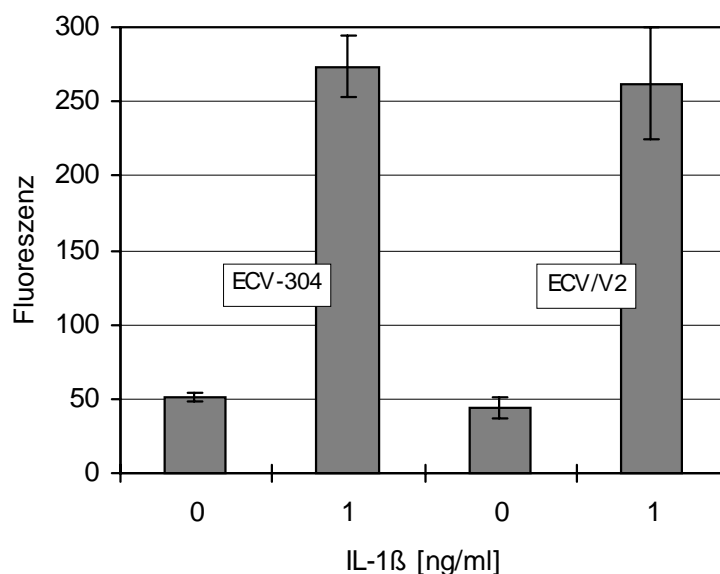


Abbildung 38: ICAM-Expression von ECV-304 und der Kontrollzelllinie ECV/V2. Die Zellen wurden für 24 h mit IL-1 β (1 ng/ml) behandelt. Anschließend wurde ICAM-1 immunologisch nachgewiesen ($n = 6$).

Als Kontrollzelllinie für den Vergleich der induzierbaren Expression von ICAM-1 wurde in den folgenden Versuchen eine Zelllinie eingesetzt, die mit dem Vektor pcDNA3 ohne Insert transfiziert und auf ihre Neomycinresistenz hin selektioniert wurde. Diese Zelllinie (ECV/V2) unterschied sich in der Expression von ICAM-1 nicht von der Ausgangszelle ECV-304 (Abb. 38).

Durch die Gegenwart des IL-1-Rezeptorantagonisten IL-1ra während der Stimulierung mit IL-1 β konnte die induzierbare Expression von ICAM-1 vollständig unterbunden werden (Abb. 39).

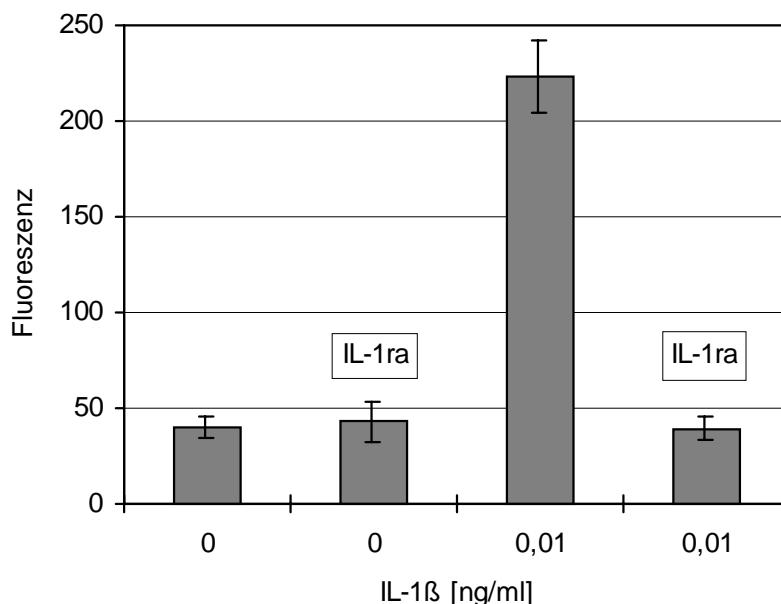


Abbildung 39: Expression von ICAM-1 in ECV/V2 nach Stimulierung mit IL-1 β in Gegenwart des Rezeptorantagonisten IL-1ra. Die Zellen wurden 24 h mit 0,01 ng IL-1 β /ml inkubiert. IL-1ra (0,5 μ g/ml) war den Zellen zeitgleich mit IL-1 zugesetzt worden (n = 6).

3.6.3 Das *Antisense*-Konstrukt für Humanzellen

Für die Herstellung eines humanen *Antisense*-Konstruktes wurde zunächst eine RT-PCR auf RNA von Jurkat E6.1 mit dem Primerpaar PBPU1 und PBPR1 durchgeführt. Ein Aliquot dieser PCR-Reaktion wurde als *Template* für eine weitere PCR mit dem Primerpaar PBPU1 und PBPR5 verwendet. Durch den Primer PBPR5 wurde an Pos. 501 der Sequenz von Mortalin eine BamHI-Schnittstelle eingeführt. Das PCR-Produkt (345 bp) wurde durch eine TA-Klonierung in den Vektor pCRII ligiert und in *E. coli* (Stamm XL1-Blue) amplifiziert. Von zehn Klonen, deren Plasmid-DNA nach Verdau mit EcoRI das Insert mit der erwarteten Größe von etwa 350 bp zeigten, wiesen drei Klone nach der Restriktion mit BamHI ebenfalls das Fragment von 350 bp auf. Diese drei Klone enthielten demnach Plasmide, welche das Insert in *Sense*-Orientierung integriert hatten; die anderen sieben Klone trugen das Insert in der erwünschten *Antisense*-Orientierung. Plasmid-DNA von einem dieser Klone mit dem Insert in *Antisense*-Orientierung

(Klon GSPBP4/3) wurde mit BamHI und EcoRV geschnitten, das Fragment von 350 bp isoliert, in den Vektor pcDNA3 ligiert und in *E. coli* amplifiziert. Pos. 156 - Pos. 501 der humanen Sequenz von Mortalin lag nun in *Antisense*-Orientierung im eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3 unter der Kontrolle des konstitutiven CMV-Promotors vor (Klon GSASH2/2).

3.6.4 Das *Antisense*-Konstrukt wird stabil in die Endothelzelllinie ECV-304 integriert

Die Liposomentransfektion von ECV-304 mit dem humanen *Antisense*-Konstrukt (Plasmid-DNA des Klonen GSASH2/2) wurde, wie unter 2.3.10.1 beschrieben, durchgeführt. Je Ansatz ($1,5 \times 10^5$ Zellen) wurde 10 μ l Lipofectamine-Reagenz und 1,5 μ g Plasmid-DNA eingesetzt. Am dritten Tag nach der Transfektion wurde mit der Selektion auf die Neomycinresistenz begonnen (600 μ g G418/ml). Am zehnten Tag wurden die resistenten Zellen vereinzelt und nach weiteren 14 Tagen konnten einzelne Klone isoliert werden (Abb. 40). 14 Klone wurden so weit expandiert, daß RNA isoliert, 1×10^7 Zellen für eine Immunopräzipitation geerntet und dreimal 5×10^6 Zellen als Kryokultur eingefroren werden konnten. Der Zeitraum zwischen Transfektion und dem Einfrieren des letzten Klones betrug knapp zwei Monate.

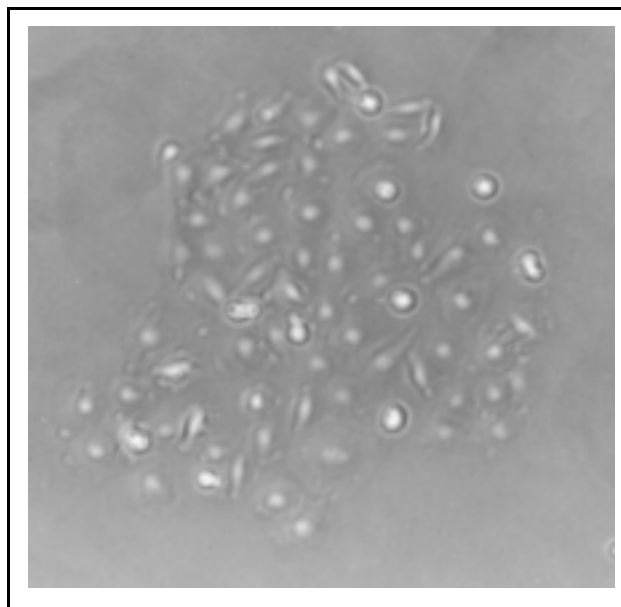


Abbildung 40: ECV/*Antisense*-Klon während der Expansion nach dem Vereinzeln. Vergrößerung: 200x

3.6.5 In einigen Klonen läßt sich die *Antisense*-RNA nachweisen

Um die *Antisense*-Klone (ECV/AS) zu analysieren, wurden Northern-Blots mit einer strangspezifischen Hybridisierungsprobe durchgeführt. In allen ECV/AS-Klonen war eine Bande von 1300 bp zu beobachten. In den nichttransfizierten Zellen erschien diese Bande nicht. Die Kontrollzelllinie ECV/V2 enthielt diese Bande ebenfalls. Bei ECV/AS11 war diese Bande nur sehr schwach zu erkennen, da hier die aufgetragene RNA-Menge gering war. In den Klonen ECV/AS1, 3, 4, 7, 8, 12 und 17 war eine Bande bei 800 bp festzustellen. Die Klone ECV/AS1, 3, 7, 12 und 17 zeigten eine mit der *Antisense*-Probe hybridisierende Bande bei 3000 bp. Im Klon ECV/AS21 war eine Bande von ungefähr 2700 bp zu beobachten (Abb. 41).

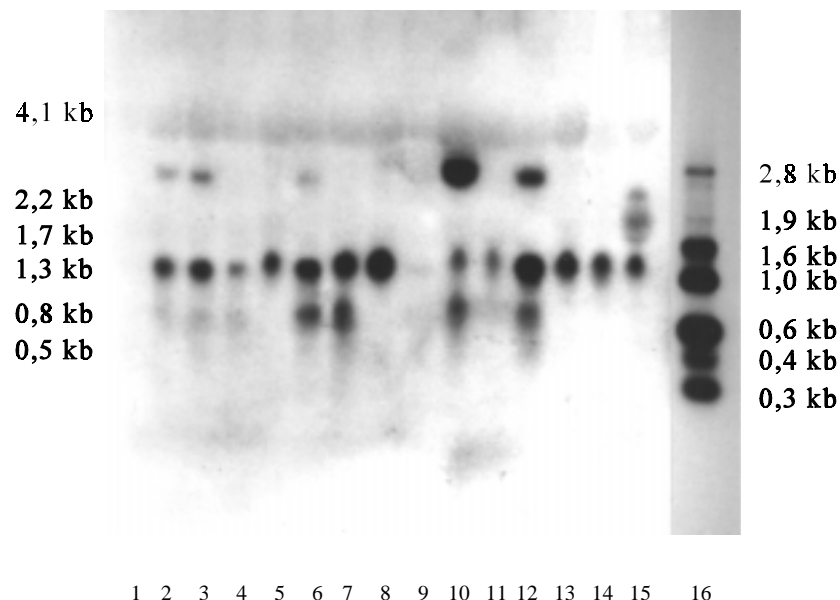


Abbildung 41: Northern-Blot der ECV/AS-Klone mit einer strangspezifischen *Antisense*-Probe. Auf einem 1,2%igen Agarose/Formaldehyd-Gel wurde die höchstmögliche RNA-Menge (20-40 µg RNA pro Spur) aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Zum Nachweis der *Antisense*-RNA wurde mit einer strangspezifischen DIG-markierten RNA-Probe, wie unter 2.6.18 beschrieben, hybridisiert und detektiert. Zur Standardisierung der RNA-Größen wurde (i) ein DIG-markierter RNA-Marker aufgetragen (Spur 16) und (ii) ein nichtmarkierter RNA-Standard nach dem Transfer auf die Membran abgetrennt und separat mit Methylenblau gefärbt; diese Größenstandards wurden auf den Film übertragen (links außen). Spur 1: ECV-304, Spur 2: ECV/AS1, Spur 3: ECV/AS3, Spur 4: ECV/AS4, Spur 5: ECV/AS5, Spur 6: ECV/AS7, Spur 7: ECV/AS8, Spur 8: ECV/AS9, Spur 9: ECV/AS11, Spur 10: ECV/AS12, Spur 11: ECV/AS15, Spur 12: ECV/AS17, Spur 13: ECV/AS19, Spur 14: ECV/AS20, Spur 15: ECV/AS21, Spur 16: DIG-markierter RNA-Marker

3.6.6 Die *Antisense*-Klone exprimieren nicht weniger Mortalin auf Proteinebene als die Kontrollzellen

In den IL-1RI-Immunopräzipitaten der verschiedenen ECV/AS-Klone konnte auf Proteinebene kein Unterschied in der Expression von Mortalin festgestellt werden. Die Bande bei 74 kD erschien in den nichttransfizierten Zellen (Abb. 42, Spur 2) und in den *Antisense*-Klonen im Verhältnis zu anderen Banden in vergleichbarer Stärke (Abb. 42, Spur 3-16). Leichte Unterschiede sind auf Schwankungen in der Proteinkonzentration zurückzuführen.

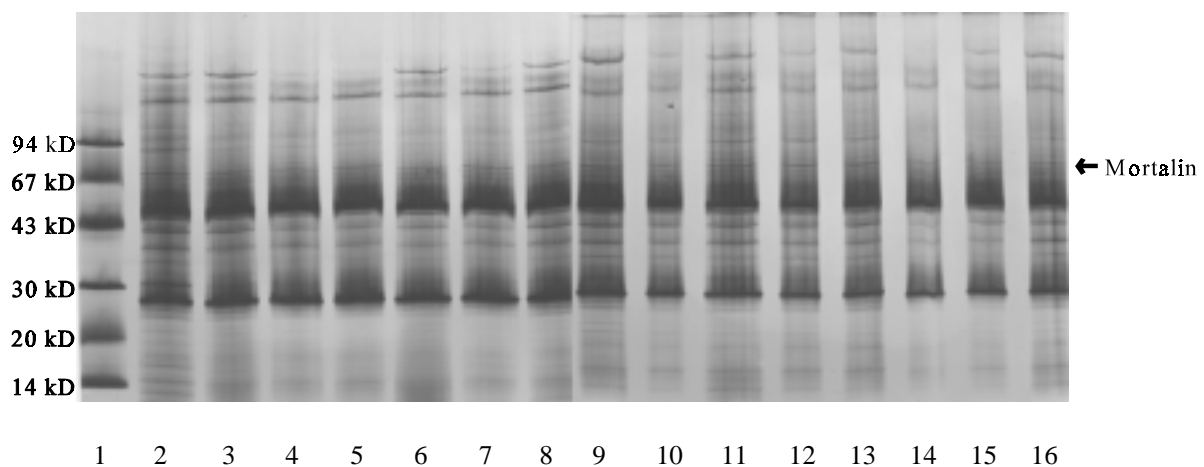


Abbildung 42: Proteinmuster von den IL-1RI-Immunopräzipitaten der verschiedenen ECV/AS-Klone. Es wurden jeweils ca. 1×10^7 Zellen für die Immunopräzipitation mit dem Antikörper 12A6, wie unter 2.5.7 beschrieben, eingesetzt. Die Proteine wurden auf einem 8-25%igen SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und durch eine Silbernitrat-Färbung sichtbar gemacht. Spur 1: Protein-Marker, Spur 2: ECV-304, Spur 3: ECV/AS1, Spur 4: ECV/AS3, Spur 5: ECV/AS4, Spur 6: ECV/AS5, Spur 7: ECV/AS7, Spur 8: ECV/AS8, Spur 9: ECV/AS9, Spur 10: ECV/AS11, Spur 11: ECV/AS12, Spur 12: ECV/AS15, Spur 13: ECV/AS17, Spur 14: ECV/AS19, Spur 15: ECV/AS20, Spur 16: ECV/AS21

3.6.7 Einige *Antisense*-Klone zeigen eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber IL-1

Von verschiedenen ECV/AS-Klonen wurde die durch IL-1 β induzierbare Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 untersucht. Um durch die Transfektion bedingte Effekte ausschließen zu können, wurde zum Vergleich die ICAM-Expression von der Zelllinie ECV/V2 gemessen, welche mit dem Vektor pcDNA3 ohne Insert transfiziert worden war. Der Klon ECV/AS1 zeigte eine um etwa 50% verminderte Stimulierbarkeit von ICAM-1. ECV/AS20 ließ sich auf ungefähr 70% der maximalen Expression im Vergleich mit der Kontrollzelllinie stimulieren. Der Klon ECV/AS5 war in der Induzierbarkeit von ICAM-1 im Vergleich mit

ECV/V2 unverändert (Abb. 43). Bei der verminderten ICAM-Expression in ECV/AS1 und ECV/AS20 handelte es sich um signifikante Unterschiede (Signifikanzniveau von 0,01) im Vergleich zur Kontrolle ECV/V2.

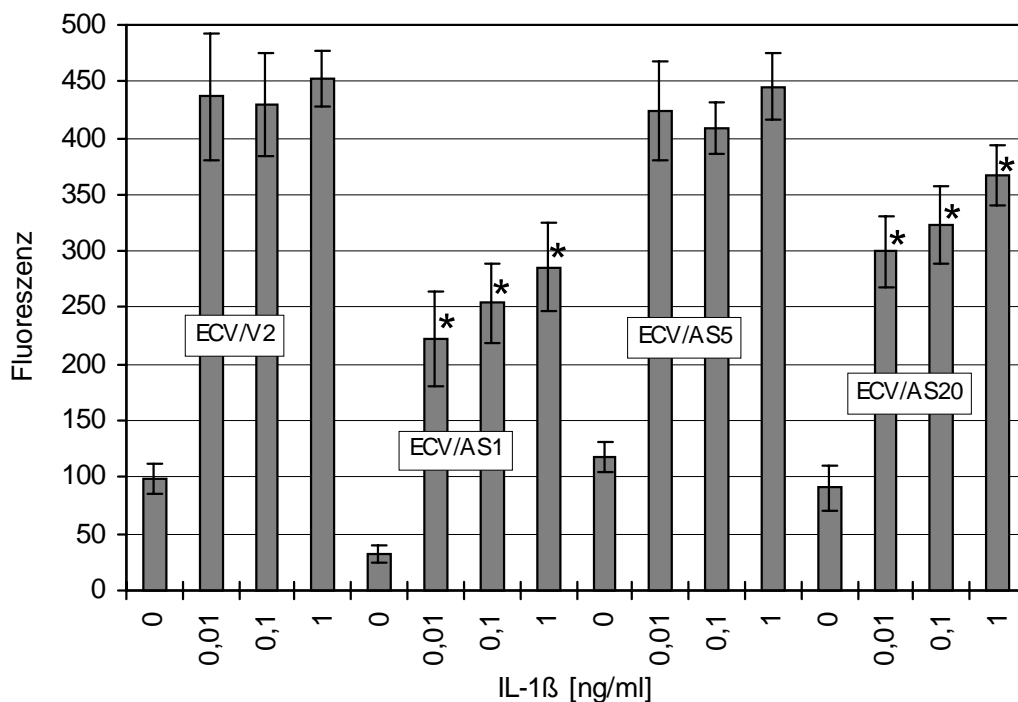


Abbildung 43: ICAM-Expression von ECV/V2, ECV/AS1, ECV/AS5 und ECV/AS20. Die Zellen wurden 24 h mit den angegebenen IL-1-Konzentrationen inkubiert und anschließend die ICAM-Färbung, wie unter 2.5.10 beschrieben, durchgeführt (n = 6). * kennzeichnet die Werte, die mit einem Signifikanzniveau von 0,01 von dem entsprechenden Kontrollwert (ECV/V2) abweichen.

Von allen getesteten Klonen zeigten ECV/AS1, ECV/AS3, ECV/AS11, ECV/AS15, ECV/AS17 und ECV/AS20 eine signifikant (Signifikanzniveau von 0,01) verminderte Induzierbarkeit von ICAM-1. ECV/AS4 und ECV/AS5 wiesen keine Unterschiede zur Kontrolle auf (zusammengefaßt in Tab. 3). Der beobachtete Effekt in der ICAM-Induktion war innerhalb von 2-3 Wochen zu reproduzieren. Nach diesem Zeitraum (4-6 Passagen) unterschieden sich die ECV/AS-Klone in Bezug auf die ICAM-Expression nicht mehr von der Kontrollzelllinie ECV/V2.

Zelllinie	induzierbare ICAM-Expression
ECV-304	+++
ECV/V2	+++
ECV/AS1	+
ECV/AS3	++
ECV/AS4	+++
ECV/AS5	+++
ECV/AS11	++
ECV/AS15	+
ECV/AS17	+
ECV/AS20	++

Tabelle 3: Durch IL-1 induzierbare ICAM-Expression von ECV-304, der Kontrollzelllinie ECV/V2 und den verschiedenen ECV/*Antisense*-Klonen. Die Zellen wurden 24 h mit IL-1 β (1 ng/ml) inkubiert und anschließend die Expression von ICAM-1 im Vergleich mit unstimulierten Zellen immunologisch nachgewiesen. Alle Messung wurden mindestens zweimal unabhängig voneinander durchgeführt, wobei jeweils sechs Parallelproben angesetzt wurden.

+++ 100% Induzierbarkeit
 ++ 90-60% Induzierbarkeit im Vergleich zur Kontrollzelllinie
 + < 60% Induzierbarkeit im Vergleich zur Kontrollzelllinie

Die Veränderung der durch IL-1 induzierbaren Expression von ICAM-1 in den ECV/AS-Klonen korrelierte nicht mit der *Antisense*-spezifischen RNA (vergl. Abb. 41): beispielsweise wiesen ECV/AS1 und ECV/AS3 die *Antisense*-spezifischen Banden bei 3000 und bei 800 bp auf, diese Klone zeigten eine verminderte ICAM-Induzierbarkeit; dahingegen konnte auch bei dem Klon ECV/AS15 die verringerte ICAM-Induktion beobachtet werden, hier waren jedoch im Northern-Blot keine *Antisense*-spezifischen Banden festzustellen.

3.7 Der *Dominant/Negative*-Ansatz

Mitglieder der Hsp70-Familie sind hochkonserviert. Ein Vergleich der bekannten Aminosäure-Sequenzen von Hsp70-Familienmitgliedern zeigt, daß die aminoterminalen zwei Drittel wesentlich höher konserviert sind als das carboxyterminale Drittel [59]. Das aminoterminale Segment trägt die ATP-bindende und -hydrolytische Aktivität [82, 125]; die variabelere carboxyterminale Domäne koppelt die aminoterminalen ATPase-Aktivität mit der Bindung an bestimmte Zielproteine [21, 140] (Abb. 44).

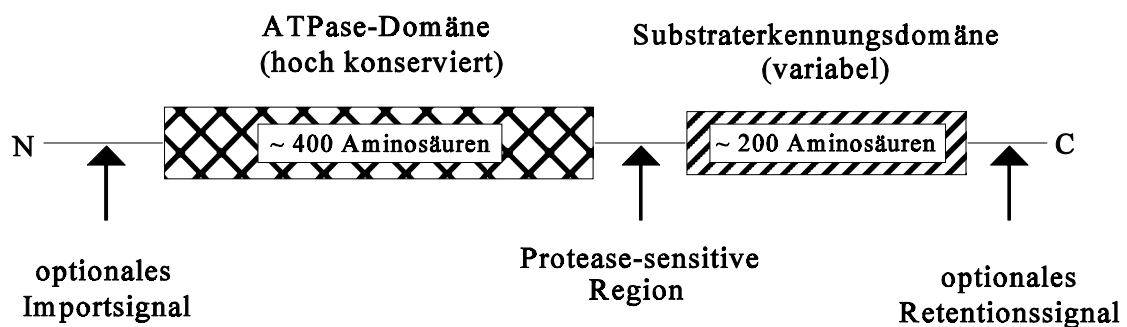


Abbildung 44: Generalisierte Struktur von Hsp70-Proteinen. Die hochkonservierte aminoterminalen ATPase-Domäne und die weniger konservierte carboxyterminale Substraterkennungsdomäne sind linearisiert dargestellt [nach 59].

Durch einen Aminosäure-Sequenzvergleich von Hsp70-Familienmitgliedern, deren Domänenstruktur definiert wurde [10], ergibt sich für Mortalin als Mitglied dieser Proteinfamilie folgende Struktur auf der Aminosäureebene:

Pos. 1 - Pos. 46:	Präsequenz
Pos 47:	aminoterminaler Beginn des reifen Proteins
Pos. 56 - Pos. 433:	ATPase-Domäne
Pos. 434 - Pos. 587:	Substraterkennungsdomäne
Pos. 588 - Pos. 679:	Oligomerisationsdomäne

Zur Analyse der Relevanz von Mortalin in Bezug auf den IL-1-Signaltransfer wurden einzelne Domänen des Proteins in Endothelzellen überexprimiert. Dadurch sollte eine Beeinflussung der Funktionalität des Proteins erreicht werden, so daß ein evtl. gegebener Einfluß auf den IL-1-Signaltransfer meßbar sein sollte.

3.7.1 Die Konstrukte zur Überexpression der Substraterkennungsdomäne und der ATPase-Domäne

Zur Herstellung eines Konstruktes für die ATPase-Domäne wurde Plasmid-DNA des Klonen GSPBP7/2 mit EcoRI geschnitten und das entstehende 1545 bp große Fragment über die Schnittstelle EcoRI in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3 eingeführt. Von zehn Klonen, deren Plasmid-DNA nach Verdau mit EcoRI das erwartete Fragment von 1550 bp aufwiesen, zeigten drei Klone nach Verdau mit EcoRV ein Fragment von 646 bp und enthielten demnach Pos. -14 - Pos. 1521 in *Sense*-Orientierung (vergl. Polylinkerregion von pcDNA3 (Abb. 2) und Restriktionsstellen in mot-3 (Abb. 58)). Einer der Klone (GSATP5/8) wurde durch Sequenzierung des Inserts und der Promotorregion überprüft und für die Transfektion eingesetzt. Zur Konstruktion eines Plasmides, welches die Information für die Substraterkennungsdomäne trägt, wurde Plasmid-DNA des Klonen GSPBP7/2 mit XhoI verdaut und das entstehende Fragment von 1051 bp über die Schnittstelle XhoI in pcDNA3 eingeführt. Plasmid-DNA-Präparationen von drei Klonen, welche nach Verdau mit XhoI die richtige Fragmentgröße (1051 bp) zeigten, wurden mit dem Primer PBPU10 partiell sequenziert. Zwei der drei Klone zeigten das 3'-Ende der Sequenz von Mot-3 mit anschließender Vektorsequenz des 3'-Bereiches der Polylinkerregion und enthielten demnach Pos. 1041 - Pos. 2054 in *Sense*-Orientierung. Das Insert und die Promotorregion eines dieser Klone (GSSUB9/9) wurde durch vollständige Sequenzierung überprüft und für die Transfektion verwendet.

3.7.2 Die DNA der Substraterkennungsdomäne und der ATPase-Domäne wird stabil in ECV-304 integriert

Die Transfektionen von ECV-304 mit dem Konstrukt für die Substraterkennungsdomäne und mit dem Konstrukt für die ATPase-Domäne wurden durch Elektroporationen, wie unter 2.3.10.2 beschrieben, vorgenommen. 24 h nach der Transfektion wurde mit der Selektion auf die Neomycinresistenz begonnen. 16 Tage später wurden die Zellen vereinzelt, und nach weiteren sieben Tagen wurden einzelne Klone isoliert und expandiert. 11 Klone mit dem integrierten Konstrukt für die Substraterkennungsdomäne (ECV/SUB...) und 12 Klone mit dem integrierten Konstrukt für die ATPase-Domäne (ECV/ATP...1) wurden soweit expandiert, daß RNA isoliert und je dreimal eine Kryokultur angelegt werden konnte. In einem erneuten Transfektionsansatz wurden weitere 18 Klone mit integriertem ATPase-Domänenkonstrukt isoliert und expandiert (ECV/ATP....2).

3.7.3 Bei einigen Klonen wird die eingeführte DNA in großer Menge transkribiert

Die resistenten Klone aus den Transfektionsansätzen wurden in Northern-Blots analysiert. Die RNA der ECV/SUB-Klone zeigte in allen Fällen eine Bande um 3000 bp, welche mit der für die Substraterkennungsdomäne spezifischen Probe hybridisierte. Diese Bande war auch bei den Wildtyp-Zellen zu beobachten. Eine weitere, deutlich schwächere Bande um 2600 bp war

ebenfalls in allen Zelllinien festzustellen. Beide Banden stellten die endogenen Transkripte für Mortalin dar. Bei drei der 11 ECV/SUB-Klone (ECV/SUB7, ECV/SUB10, ECV/SUB11) war eine zusätzliche deutliche Bande in der Größe um 1300 bp zu erkennen. Bei einem weiteren Klon (ECV/SUB2) war diese Bande sehr schwach vorhanden. Hierbei handelte es sich um die Transkripte der eingeführten Substraterkennungsdomänen-DNA (Abb. 45).

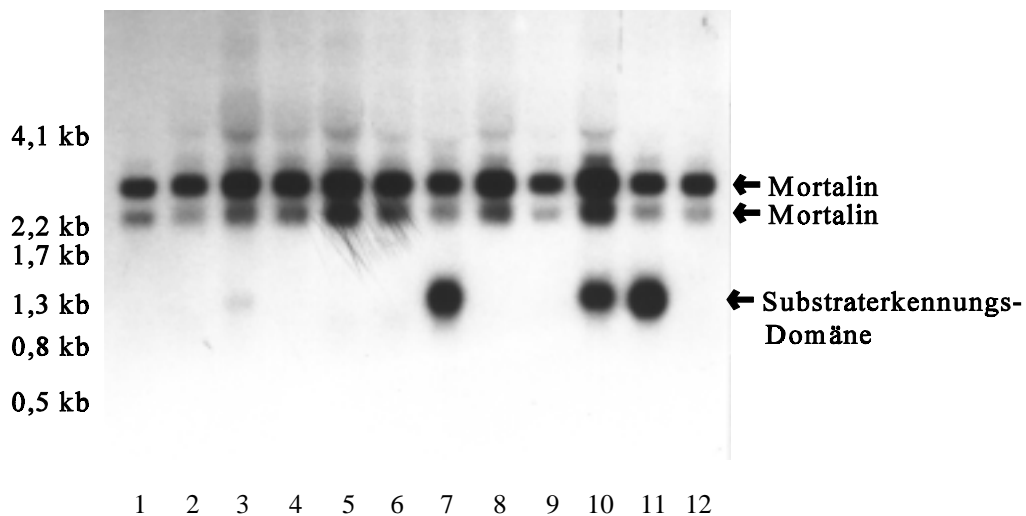


Abbildung 45: Northern-Blot der ECV/SUB-Klone mit einer für die Substraterkennungsdomäne spezifischen RNA-Probe. Auf einem 1,2%igen Formaldehyd/Agarose-Gel wurde pro Spur 8 µg Gesamt-RNA von ECV-304 und den ECV/SUB-Klonen aufgetrennt. Nach dem Kapillartransfer auf eine Nylonmembran wurde mit einer DIG-markierten RNA-Probe für die Substraterkennungsdomäne, wie unter 2.6.18 beschrieben, hybridisiert und detektiert. Spur 1: ECV-304, Spur 2: ECV/SUB1, Spur 3: ECV/SUB2, Spur 4: ECV/SUB3, Spur 5: ECV/SUB4, Spur 6: ECV/SUB6, Spur 7: ECV/SUB7, Spur 8: ECV/SUB8, Spur 9: ECV/SUB9, Spur 10: ECV/SUB10, Spur 11: ECV/SUB11, Spur 12: ECV/SUB12

ECV-304 und die ECV/ATP-Klone zeigten im Northern-Blot neben einigen unspezifischen Hybridisierungen die Banden des endogenen Mortalin bei 3000 bp und bei 2600 bp. Bei fünf der insgesamt 30 Klone war eine weitere Bande bei 2000 bp zu beobachten, welche das Transkript der eingeführten ATPase-Domänen-DNA darstellte. Diese Bande war bei zwei Klonen (ECV/ATP11.1 und ECV/ATP2.2) relativ schwach und bei drei Klonen (ECV/ATP9.1, ECV/ATP8.2, ECV/ATP10.2) sehr stark vertreten (Abb. 46).

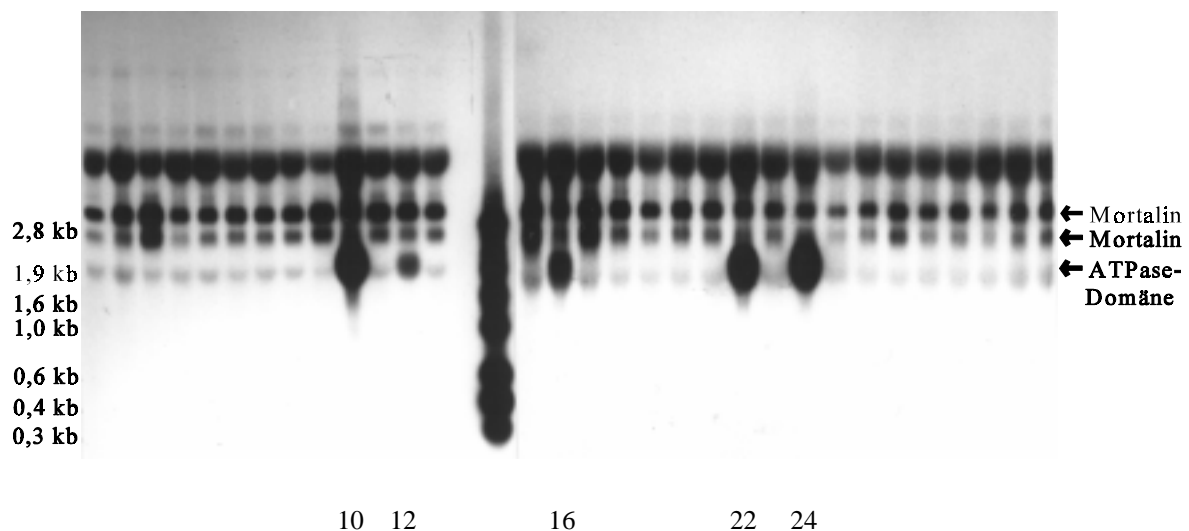


Abbildung 46: Northern-Blot der ECV/ATP-Klone mit einer für die ATPase-Domäne spezifischen Hybridisierungsprobe. 8 µg Gesamt-RNA der ECV/ATP-Klone wurde auf einem 1,2%igen Formaldehyd/Agarose-Gel aufgetrennt, geblottet und mit einer ATPase-Domänen-spezifischen DIG-gelabelten RNA-Probe hybridisiert und detektiert (siehe 2.6.18). Spur 1: ECV-304, Spur 2: ECV/ATP1.1, Spur 3: ECV/ATP2.1, Spur 4: ECV/ATP3.1, Spur 5: ECV/ATP4.1, Spur 6: ECV/ATP5.1, Spur 7: ECV/ATP6.1, Spur 8: ECV/ATP7.1, Spur 9: ECV/ATP8.1, Spur 10: ECV/ATP9.1, Spur 11: ECV/ATP10.1, Spur 12: ECV/ATP11.1, Spur 13: ECV/ATP12.1, Spur 14: DIG-gelabelter RNA-Marker, Spur 15: ECV/ATP1.2, Spur 16: ECV/ATP2.2, Spur 17: ECV/ATP3.2, Spur 18: ECV/ATP4.2, Spur 19: ECV/ATP5.2, Spur 20: ECV/ATP6.2, Spur 21: ECV/ATP7.2, Spur 22: ECV/ATP8.2, Spur 23: ECV/ATP9.2, Spur 24: ECV/ATP10.2, Spur 25: ECV/ATP11.2, Spur 26: ECV/ATP12.2, Spur 27: ECV/ATP13.2, Spur 28: ECV/ATP14.2, Spur 29: ECV/ATP15.2, Spur 30: ECV/ATP16.2, Spur 31: ECV/ATP17.2, Spur 32: ECV/ATP18.2

3.7.4 Die Transkription der eingeführten DNA bleibt über einen längeren Zeitraum konstant

Um zu untersuchen, ob die Transkription der Domänen-DNA über einen längeren Zeitraum unverändert blieb, wurden Präparationen von Gesamt-RNA aus den Klonen ECV/ATP9.1 und ECV/ATP11.1 im Abstand von drei Wochen durchgeführt. Der Northern-Blot mit der ATPase-Domänen-spezifischen Hybridisierungsprobe zeigte ein unverändertes Bild der hybridisierenden Banden zu beiden Zeitpunkten (Abb. 47). ECV/ATP9.1 wies zum ersten Zeitpunkt (Spur 3) sowie nach drei Wochen Kultivierungszeit (Spur 4) eine sehr starke Bande um 2000 bp auf. ECV/ATP11.1 zeigte diese Bande in beiden Präparationen in schwächerer Intensität (Spur 5 und 6).

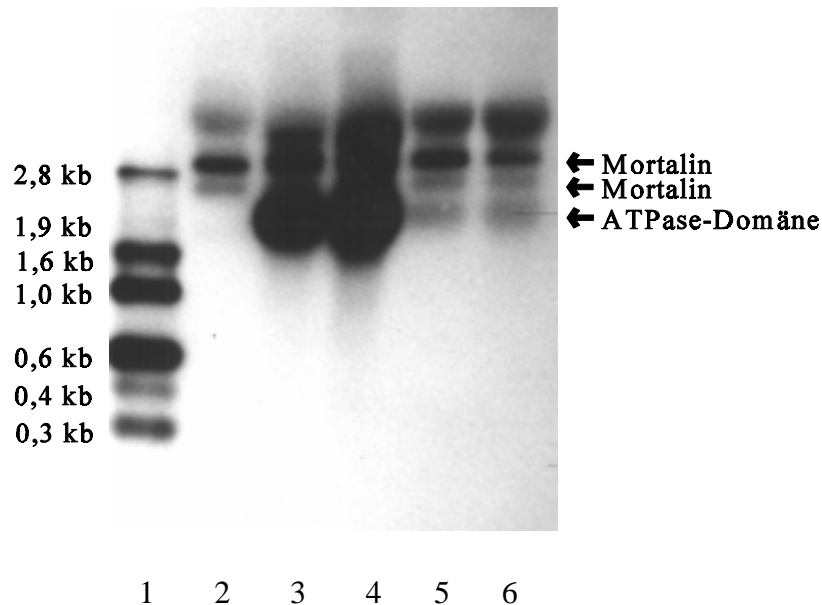


Abbildung 47: Northern-Blot von ECV/ATP-Klonen mit RNA-Präparationen nach verschiedenen langen Kultivierungszeiten. Die Isolierung der Gesamt-RNA von ECV/ATP9.1 und ECV/ATP11.1 wurde im Abstand von drei Wochen mit der jeweils selben Kulturlinie durchgeführt. 5 µg Gesamt-RNA wurde in einem 1,2%igen Agarose/Formaldehyd-Gel aufgetrennt, geblottet und mit einer für die ATPase-Domäne spezifischen DIG-markierten RNA-Probe hybridisiert (siehe 2.6.18). Spur 1: RNA-Marker, Spur 2: ECV/V2, Spur 3: ECV/ATP9.1, Spur 4: ECV/ATP9.1 nach weiteren drei Wochen Kultivierung, Spur 5: ECV/ATP11.1, Spur 6: ECV/ATP 11.1 nach weiteren drei Wochen Kultivierung

3.7.5 Das durch die eingeführte DNA codierte Protein ist nicht nachzuweisen

Die Proteinmuster der Zellextrakte der ECV/SUB- und ECV/ATP-Klone zeigten keine Banden, die die jeweiligen Domänen hätten darstellen können. Für die Substraterkennungsdomäne wäre eine 40 kD große und für die ATPase-Domäne eine 61 kD große Proteinbande zu erwarten gewesen (Abb. 48).

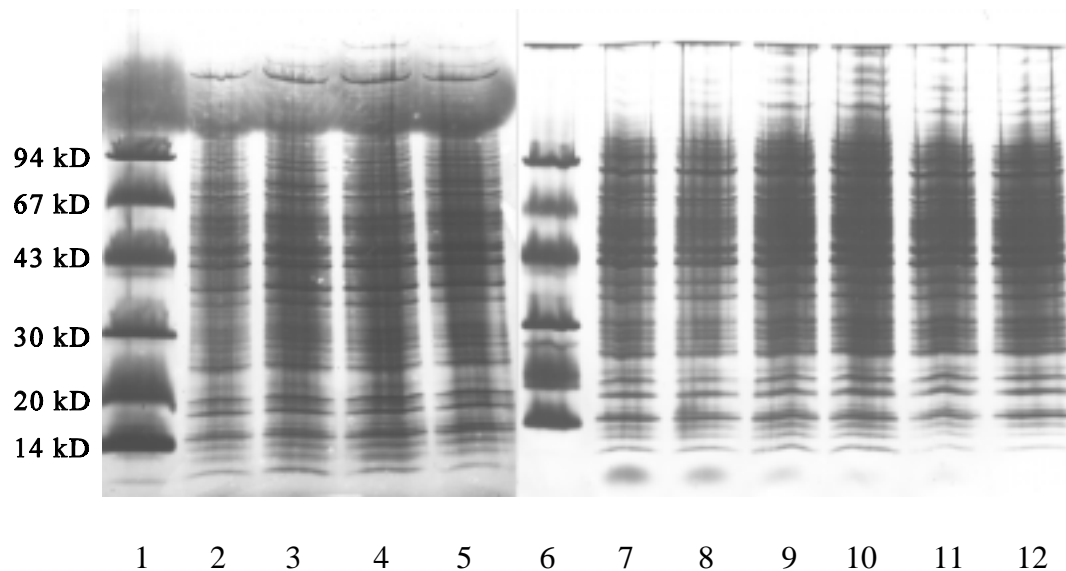


Abbildung 48: Proteinmuster der ECV/SUB- und ECV/ATP-Klone. 1×10^7 Zellen wurden in 750 μ l Lysepuffer aufgeschlossen und nicht zentrifugiert. Ein Aliquot dieses groben Zellextraktes wurde unter denaturierenden Bedingungen auf einem 8-25%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Pro Spur wurde 15 ng Protein aufgetragen. Die Proteinfärbung erfolgte mit Silbernitrat. Spur 1: Protein-Marker, Spur 2: ECV/V2, Spur 3: ECV/SUB7, Spur 4: ECV/SUB10, Spur 5: ECV/SUB11, Spur 6: Protein-Marker, Spur 7: ECV/V2, Spur 8: ECV/ATP9.1, Spur 9: ECV/ATP11.1, Spur 10: ECV/ATP2.2, Spur 11: ECV/ATP8.2, Spur 12: ECV/ATP10.2

Mit den Hsp70-spezifischen Antikörpern 3a3, BRM-22 und Anti-Mot konnte in den Zellextrakten der ECV/SUB- und der ECV/ATP-Klone kein rekombinantes Protein festgestellt werden. Je nach eingesetztem Antikörper wurden ein oder mehrere Proteine im Bereich von 70 kD detektiert; alle Bandenmuster waren bei der Kontrollzelle ECV/V2 und den Klonen, welche die eingeführte Domänen-DNA transkribierten, identisch (Abb. 49 und Abb. 50). Bei den verschiedenen Banden um 70 kD handelte es sich also um die endogenen Vertreter der Hsp70-Familie.

Es war zu erwarten gewesen, daß zumindest der polyklonale Peptidantikörper Anti-Mot die Substraterkennungsdomäne hätte detektieren können. Die Epitope der anderen beiden Antikörper sind nicht bekannt.

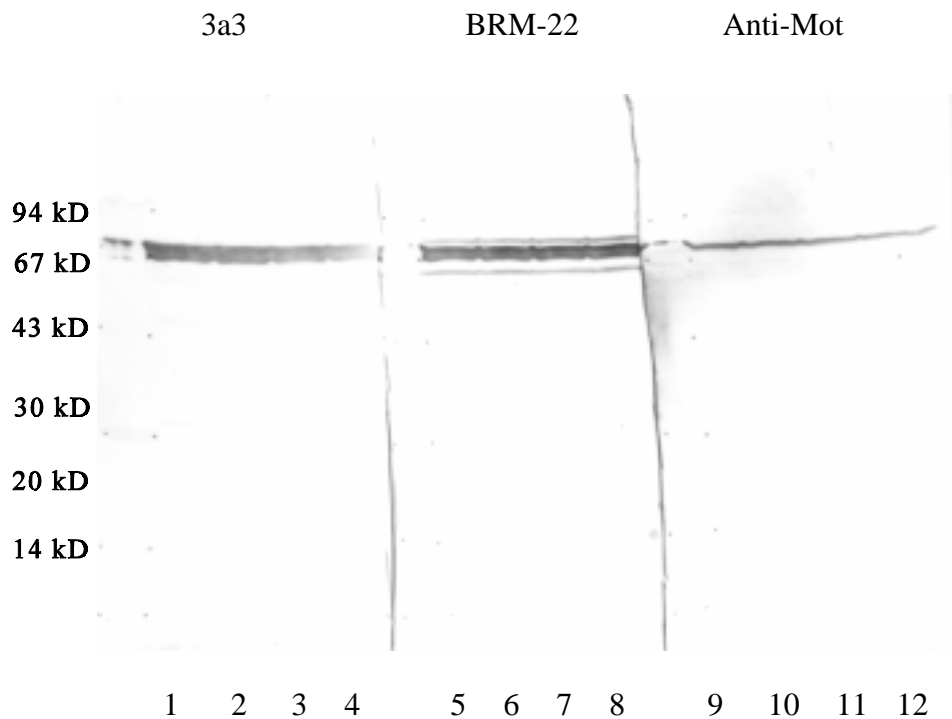


Abbildung 49: Western-Blots der ECV/SUB-Klone mit verschiedenen Antikörpern. 20 µg Protein pro Spur wurde auf einem 12%igen SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran im *Semi Dry*-Verfahren übertragen. Der immunologische Nachweis mit den Antikörpern 3a3, BRM-22 und Anti-Mot wurde, wie unter 2.5.6 beschrieben, durchgeführt. Spur 1: ECV/V2 (3a3), Spur 2: ECV/SUB7 (3a3), Spur 3: ECV/SUB10 (3a3), Spur 4: ECV/SUB11 (3a3), Spur 5: ECV/V2 (3a3), Spur 6: ECV/SUB7 (BRM-22), Spur 7: ECV/SUB10 (BRM-22), Spur 8: ECV/SUB11 (BRM-22), Spur 9: ECV/V2 (Anti-Mot), Spur 10: ECV/SUB7 (Anti-Mot), Spur 11: ECV/SUB10 (Anti-Mot), Spur 12: ECV/SUB11 (Anti-Mot)

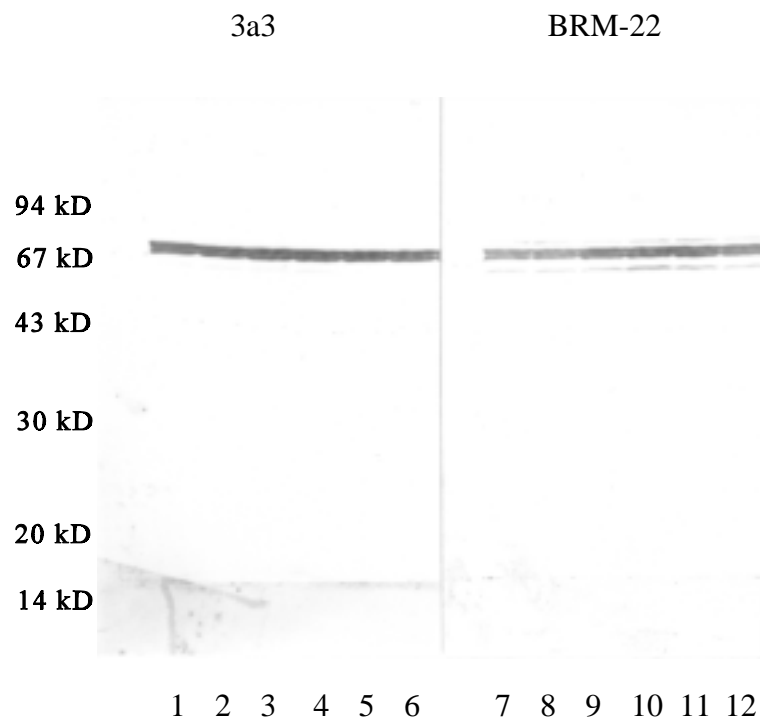


Abbildung 50: Western-Blots der ECV/ATP-Klone mit verschiedenen Antikörpern. 20 µg Protein pro Spur wurde auf einem 12%igen SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der immunologische Nachweis erfolgte mit den Antikörpern 3a3 und BRM-22. Spur 1: ECV/V2 (3a3), Spur 2: ECV/ATP9.1 (3a3), Spur 3: ECV/ATP11.1 (3a3), Spur 4: ECV/ATP2.2 (3a3), Spur 5: ECV/ATP8.2 (3a3), Spur 6: ECV/ATP10.2 (3a3), Spur 7: ECV/V2 (BRM-22), Spur 8: ECV/ATP9.1 (BRM-22), Spur 9: ECV/ATP11.1 (BRM-22), Spur 10: ECV/ATP2.2 (BRM-22), Spur 11: ECV/ATP8.2 (BRM-22), Spur 12: ECV/ATP10.2 (BRM-22)

3.7.6 Die Klone mit Substraterkennungsdomäne sind in der durch IL-1 induzierbaren Expression von Adhäsionsmolekülen unverändert

Nachdem die ECV/SUB-Klone, welche die eingeführte DNA transkribierten, mit verschiedenen Konzentrationen von IL-1 β stimuliert wurden, wurde die Expression von ICAM-1 auf der Zelloberfläche gemessen. Die Kontrollzelllinie ECV/V2 und die Klone ECV/SUB7, ECV/SUB10 und ECV/SUB11 wiesen keine eindeutigen Unterschiede in der Expression dieses Adhäsionsmoleküls auf (Abb. 51).

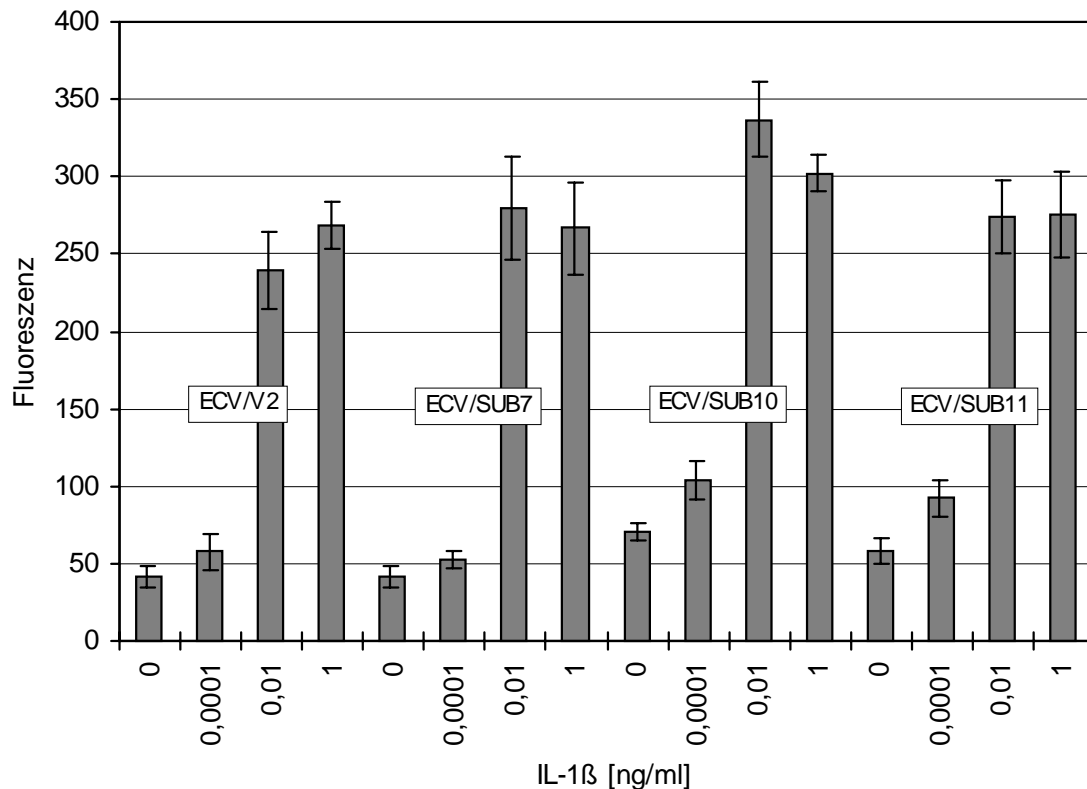


Abbildung 51: Expression von ICAM-1 nach Stimulierung mit IL-1 β in den ECV/SUB-Klonen. Pro Meßpunkt wurden 5×10^4 Zellen einen Tag vor dem Start der Stimulierung angesät. Nach 24 h Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen von IL-1 β wurden die Zellen fixiert und die ICAM-Expression immunologisch, wie unter 2.5.10 angegeben, nachgewiesen (n = 6).

3.7.7 Einige der Klone mit ATPase-Domäne zeigen eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber IL-1 bei der induzierbaren Expression von Adhäsionsmolekülen

Nach Stimulierung mit IL-1 β zeigten einige der ECV/ATP-Klone eine signifikant verminderte Expression von ICAM-1 im Vergleich mit der Kontrollzelle ECV/V2 (Abb. 52). ECV/ATP9.1 zeigte eine Verringerung der induzierbaren ICAM-1-Expression um ca. 50%, ECV/ATP11.1 und ECV/ATP2.2 wiesen keine deutliche Veränderung in der ICAM-1-Expression auf. ECV/ATP8.2 exprimiert etwa 15% weniger ICAM-1 als die Kontrollzelle. Die Stimulierung von ECV/ATP10.2 mit IL-1 führte zu einer um rund 75% niedrigeren Expression von ICAM-1 verglichen mit ECV/V2.

Das Verhalten der ECV/ATP-Klone in Bezug auf die induzierbare ICAM-Expression korrelierte nicht eindeutig mit der Menge an transkribierter RNA der integrierten ATPase-Domänen-DNA (vergl. Abb. 46): ECV/ATP11.1 und ECV/ATP2.2, die die ATPase-Domänen-DNA relativ wenig transkribierten, zeigten keine veränderte ICAM-Expression. ECV/ATP9.1 und ECV/ATP10.2 wiesen viel Domänen-RNA und eine signifikant verringerte ICAM-Expression

auf (Signifikanzniveau von 0,03). ECV/ATP8.2 zeigte eine etwas verminderte, jedoch nicht signifikant abweichende ICAM-Expression, obwohl die Transkription der Domänen-DNA sehr hoch war.

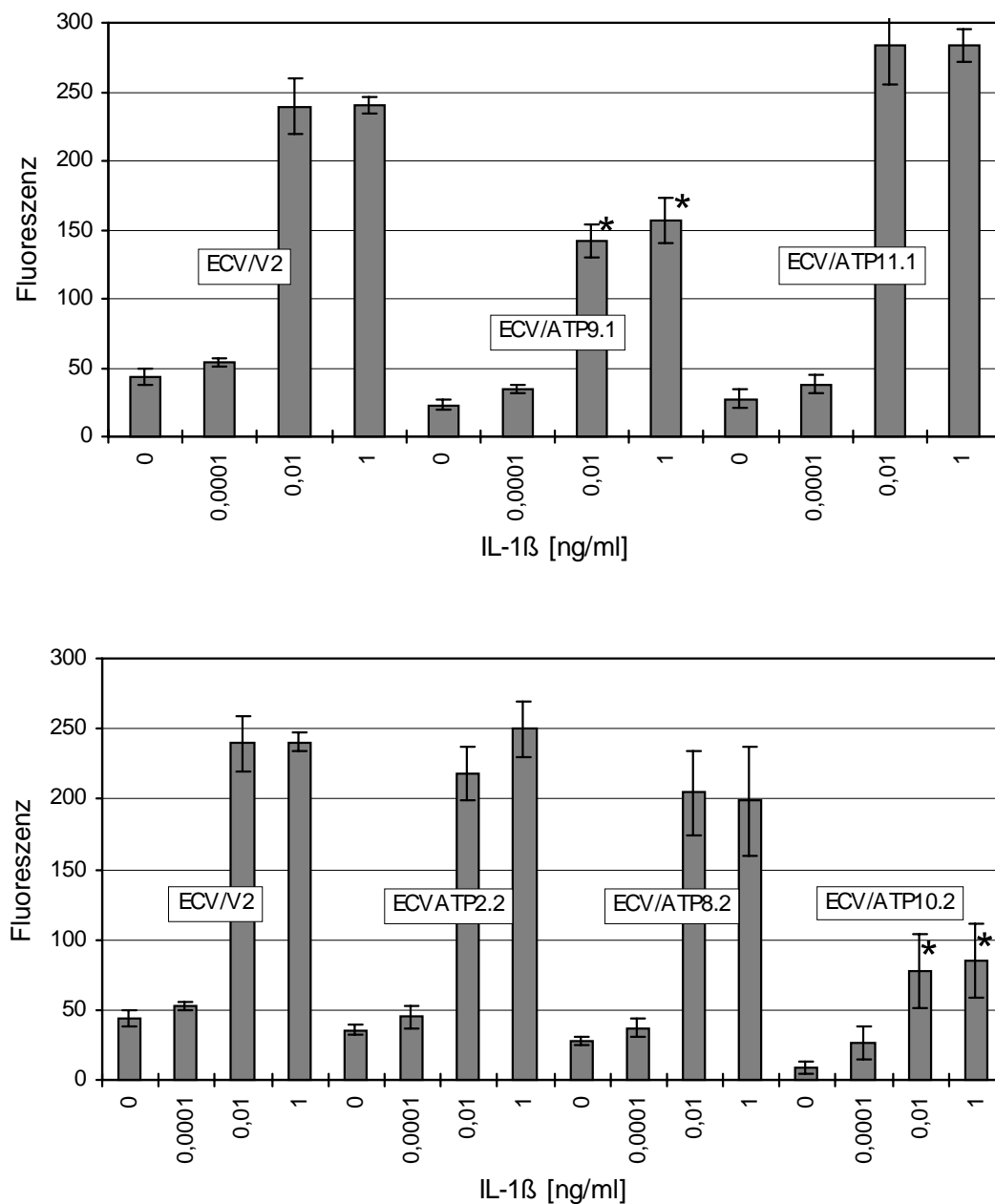


Abbildung 52: ICAM-Expression der ECV/ATP-Klone nach Stimulierung mit IL-1β. Die Zellen wurden 24 h mit den angegebenen Konzentrationen von IL-1β behandelt. Nach der Fixierung der Zellen wurde ICAM-1 immunologisch mit anschließender Fluoreszenzdetektion nachgewiesen (n = 6). * kennzeichnet die signifikant niedrigeren Werte im Vergleich mit der Kontrolle ECV/V2 bei einem Signifikanzniveau von 0,03.

3.8 Die Lokalisation von Mortalin

3.8.1 Mortalin läßt sich in den Mitochondrien nachweisen

Die Untersuchungen zur intrazellulären Verteilung von Mortalin wurden mit dem gereinigten polyklonalen Antikörper Anti-Mot durchgeführt. Als Fixanz für die immunohistochemischen Versuche wurde 1% Formaldehyd verwendet. Der Einsatz von Glutaraldehyd war ungeeignet, da sich in entsprechenden Vorversuchen herausgestellt hatte, daß schon eine geringe Konzentration von Glutaraldehyd die Bindung von Antigen und Antikörper verhindert.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (TEM) der mit dem Antikörper Anti-Mot markierten Zellschnitte wiesen deutliche Signale in den Mitochondrien auf (Abb. 53 und Abb. 54). Vereinzelte Signale konnten auch im Cytosol und im Kernbereich der Zelle festgestellt werden, wobei jedoch nicht auszuschließen ist, daß es sich hierbei um Artefakte oder Hintergrundsignale handelte. Dieses Bild war unabhängig vom Stimulierungsstatus der Zellen zu beobachten.

Die Immunofluoreszenz-Aufnahmen der mit Anti-Mot markierten Zellen zeigten gleichfalls eine Lokalisation von Mortalin in den Mitochondrien, wie durch eine parallele Anfärbung der Zellen mit einem hochspezifischen Mitotracker belegt wurde (Abb. 55 und Abb. 56). Dieser Befund war, wie auch schon bei der Elektronenmikroskopie, bei unstimulierten und mit IL-1 stimulierten Zellen identisch.

Abbildung 55 (Seite 116): Lokalisation von Mortalin in unstimulierten Zellen (Immunofluoreszenz). Die fixierten Zellen (EL4-6.1) wurden auf einen Objektträger gegeben und mit Triton X-100 behandelt; anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper Anti-Mot. Die Antigen-Antikörperbindung wurde durch einen sekundären, mit FITC gekoppelten Antikörper im Konfokalmikroskop sichtbar gemacht. Die Zellprobe war vor der Markierung mit einem hochspezifischen Mitochondrien-Marker behandelt worden (siehe 2.5.14.2). oberer Bildteil: Schnittserie des Signals des Mitotrackers, Anregung mit 568 nm; unterer Bildteil: Schnittserie mit dem Signal der FITC-Markierung von Mortalin, Anregung mit 488 nm

Abbildung 56 (Seite 117): Lokalisation von Mortalin in mit IL-1 β stimulierten Zellen (Immunofluoreszenz). Die Zellen (EL4-6.1) wurden 30 min mit 10 ng IL-1 β /ml bei einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml behandelt, bevor die Probenaufbereitung für die Immunofluoreszenz erfolgte (siehe 2.5.14.2). oberer Bildteil: Schnittserie des Signals des Mitotrackers, Anregung mit 568 nm; unterer Bildteil: Schnittserie mit dem Signal der FITC-Markierung von Mortalin, Anregung mit 488 nm

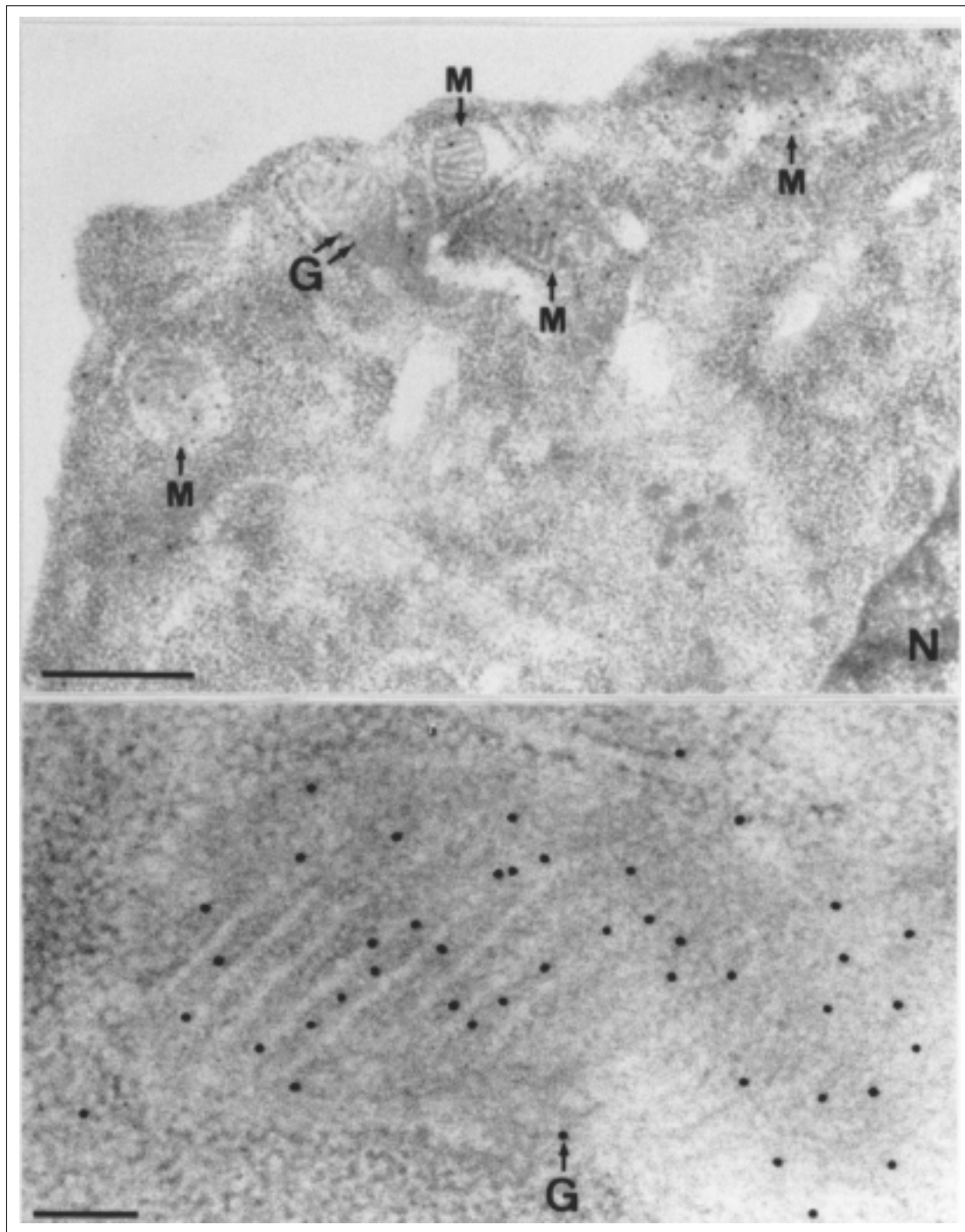


Abbildung 53: Lokalisation von Mortalin in der unstimulierten Zelle (TEM). Nach dem Einbetten und Schneiden wurden die Zellschnitte (EL4-6.1) mit dem spezifischen Antikörper Anti-Mot und Protein A-Goldpartikeln behandelt (siehe 2.5.14.1). Die Antikörperversdünnung im oberen Bildteil betrug 1:20, im unteren Bildteil 1:5. M: Mitochondrien, N: Nukleus, G: Goldpartikel, Vergrößerungsbalken oben: 0.5 μm , Vergrößerungsbalken unten: 0.2 μm

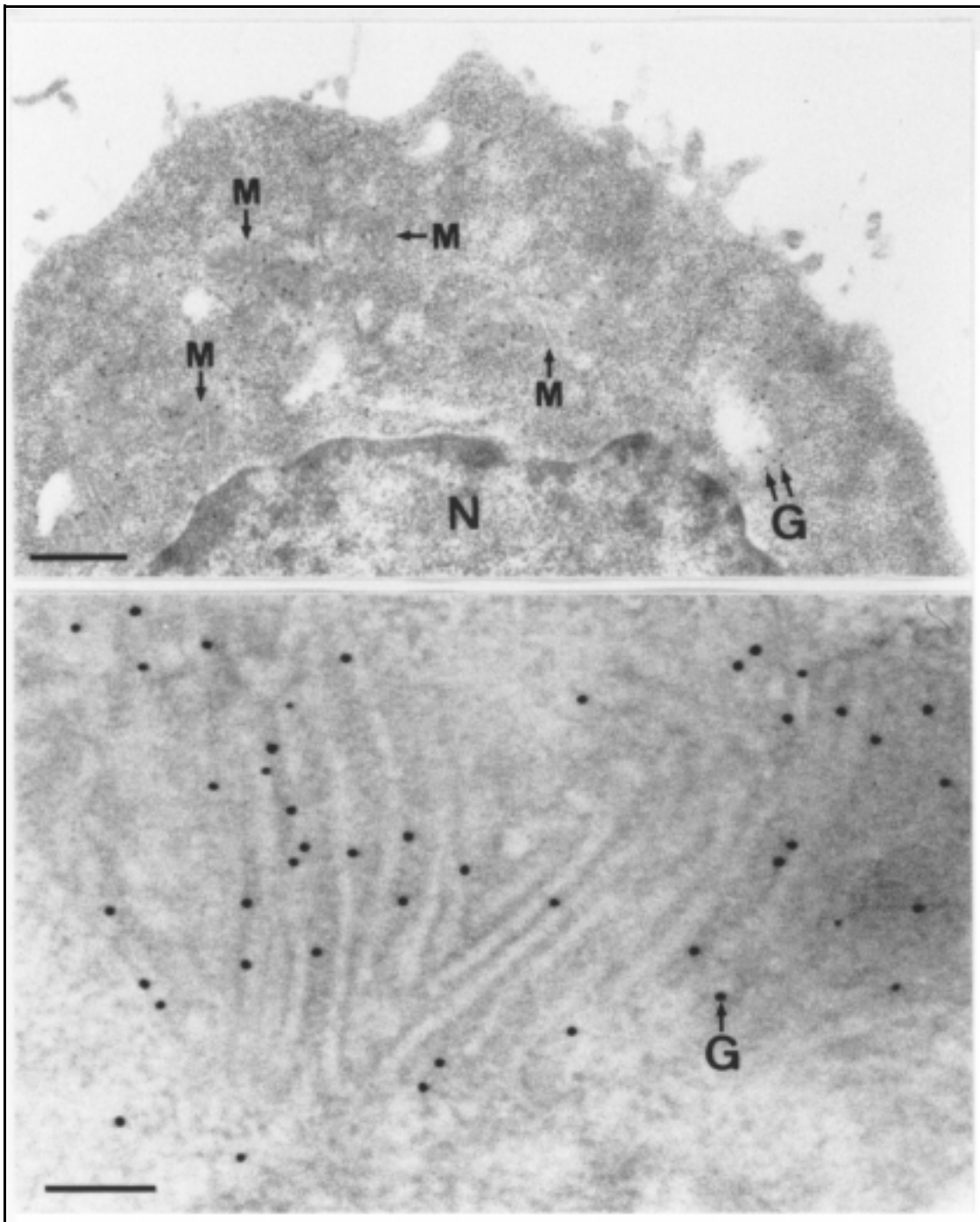
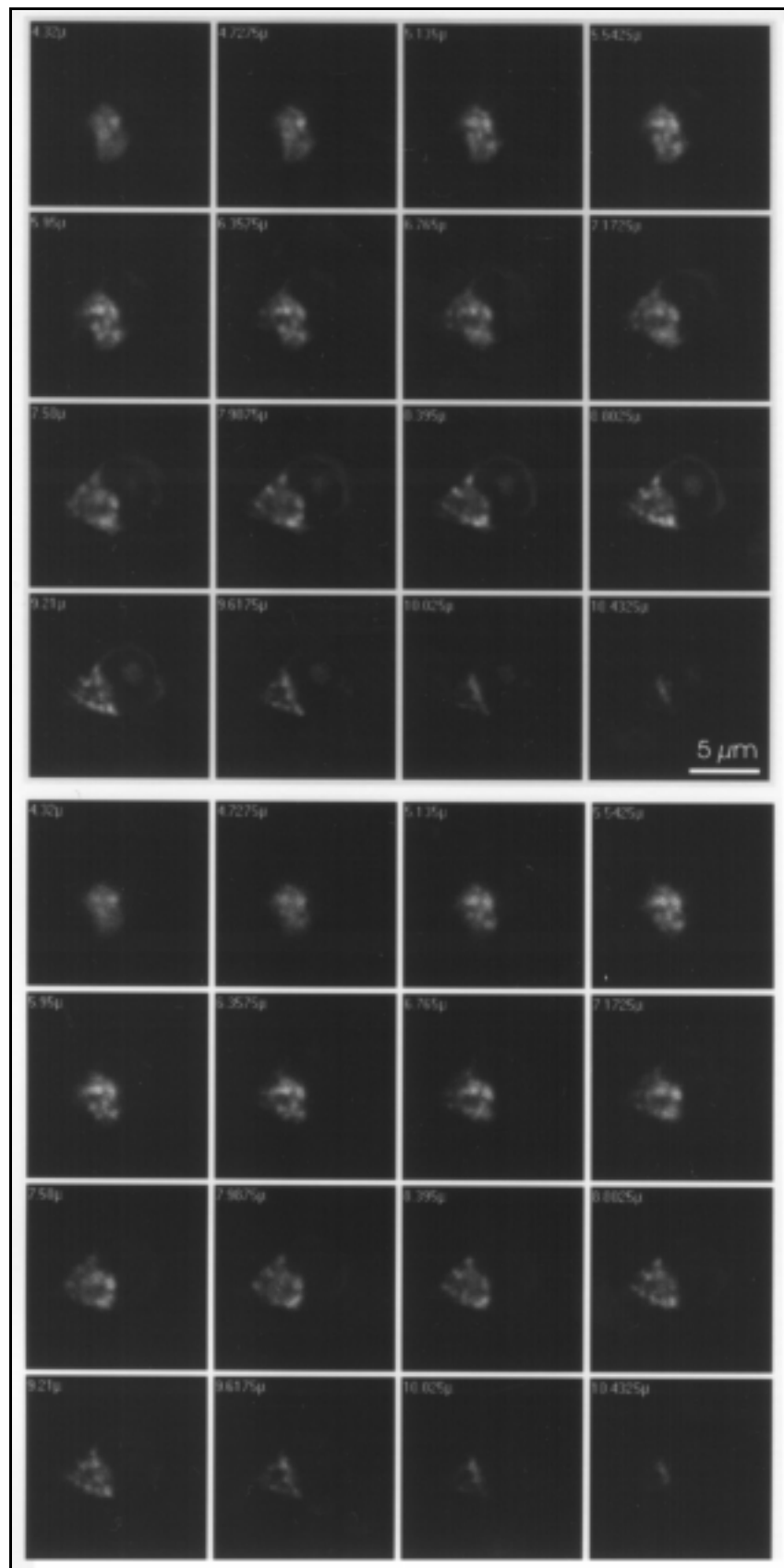
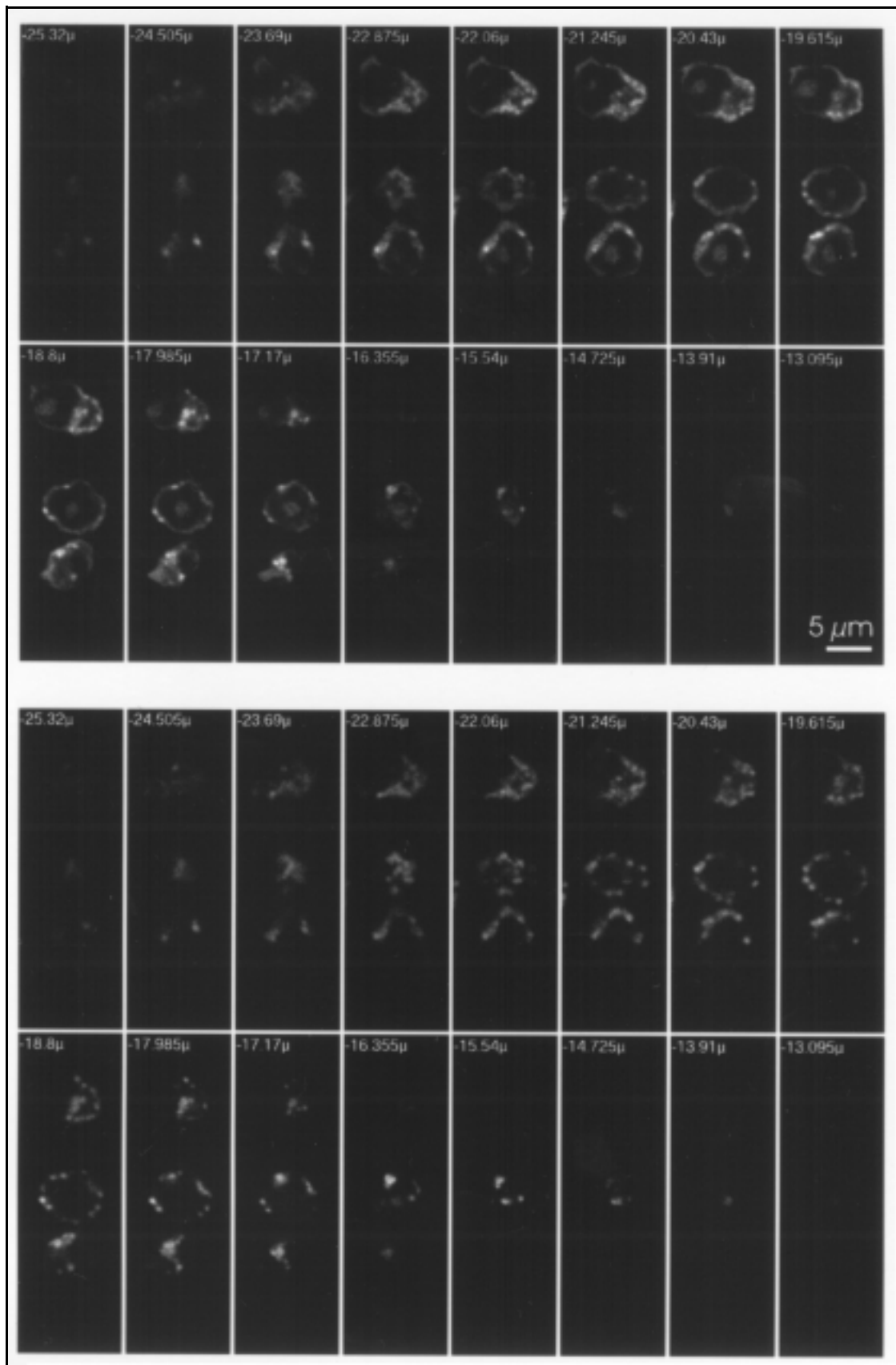


Abbildung 54: Lokalisation von Mortalin in der mit IL-1 stimulierten Zelle (TEM). Die Zellen (EL4-6.1) wurden 30 min mit 10 ng IL-1 β /ml bei einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml behandelt. Nach dem Einbetten und Schneiden wurden die Zellschnitte mit dem spezifischen Antikörper Anti-Mot und Protein A-Goldpartikeln behandelt (siehe 2.5.14.1). Die Antikörperverdünnung im oberen Bildteil betrug 1:20, im unteren Bildteil 1:5. M: Mitochondrien, N: Nukleus, G: Goldpartikel, Vergrößerungsbalken oben: 0.5 μ m, Vergrößerungsbalken unten: 0.2 μ m





4 Diskussion

Am Beginn dieser Arbeit standen Ergebnisse von M. Martin (MH Hannover), der durch eine Immunopräzipitation mit einem Antikörper gegen den IL-1-Rezeptor aus einer T-Zelllinie eine Kinase isolierte, die in ihrer Aktivität von einer Stimulierung der Zellen mit Interleukin-1 abhängig war [105]. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Kinase näher zu charakterisieren und weitere Komponenten zu identifizieren, die mit dem IL-1-Rezeptor assoziiert und im Signaltransfer involviert sind.

4.1 Die rezeptorassoziierte Kinase

Neben der schon beschriebenen Kinase in den Zelllinien EL4-6.1 und D10N (murine T-Zelllinien), die am IL-1-Rezeptor assoziiert ist [105], konnte eine entsprechende Kinase in der Lebercarcinom-Zelllinie HepG2 beobachtet werden. Vergleichbar mit EL4-6.1 phosphorylierte die durch IL-1 stimulierbare Kinase im Immunopräzipitat des IL-1-Rezeptors von HepG2 ein endogenes Substrat von etwa 60 kD. In beiden Fällen war die Aktivierung der Kinase durch den Rezeptorantagonisten IL-1ra zu verhindern.

Die rezeptorassoziierte Kinase in HepG2 wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weiter charakterisiert; es ist jedoch festzustellen, daß die Assoziation einer Kinase am IL-1-Rezeptor nicht auf die T-Zelllinien EL4-6.1 und D10N beschränkt ist. In weiteren untersuchten Modellen, wie der humanen Endothelzelllinie ECV-304 und der humanen T-Zelllinie Jurkat E6.1, war eine vergleichbare Kinaseaktivität, die durch IL-1 stimulierbar ist und ein endogenes Substrat im IL-1-RI-Immunopräzipitat phosphoryliert, nicht festzustellen. Interessanterweise beschreiben Bird et al. eine durch IL-1 zu aktivierende Kinase ebenfalls in den Zelllinien EL4-6.1 und HepG2 [11]. 1995 wurde eine durch IL-1 zu aktivierende Kinase beschrieben, deren Assoziation mit dem IL-1-Rezeptor für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B durch IL-1 notwendig ist [32]. Die Reinigung und Klonierung dieser als IRAK bezeichneten Kinase wurde 1996 veröffentlicht [19], und es ist sehr wahrscheinlich, daß dieses Enzym mit der von Martin et al. [105] beschriebenen Kinase identisch ist. Infolge der Bindung des Liganden an den IL-1-Rezeptor wird IRAK phosphoryliert, entweder durch eine Autophosphorylierung oder durch die Phosphorylierung durch eine weitere Kinase. Abhängig vom Phosphorylierungszustand erscheint IRAK als eine 80-100 kD große Bande im SDS-PAGE [19]. Eine weitergehende Charakterisierung dieser rezeptorassoziierten Kinase ist bisher jedoch noch nicht erfolgt.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Kinase des Immunopräzipitates ein Enzymtest mit Phosphocellulose-Einheiten etabliert, um die quantitative Auswertung einer Charakterisierung dieses Enzyms zu erleichtern. Die Immunopräzipitate von 2×10^7 Zellen, die 10 min mit 10 ng IL- β /ml stimuliert worden waren, zeigten einen Substratumsatz von 1-1,5 pmol ATP h⁻¹. Die Kinaseaktivität von Immunopräzipitaten aus Zellen, die in einem Durchflußfermenter kultiviert worden waren, war um etwa 30% geringer. Das Einfrieren des Zellextraktes oder des Immunopräzipitates ging mit Einbußen der Aktivität um ca. 50% einher. Das Einfrieren und die

Lagerung von Zellmaterial ließ sich allerdings nicht vermeiden, denn die für die Enzymmessung benötigten Zellmengen wären durch eine Kultur in Zellkulturflaschen schwer zu handhaben gewesen, so daß auf Zellen aus der Fermenterkultur zurückgegriffen werden mußte. I.d.R. wurden für jeden Meßwert zwei parallele Immunopräzipitate analysiert. Die Streuung der Meßergebnisse war z. T. recht hoch, denn ein Problem bei der Durchführung des Enzymtests mit Phosphocellulose-Einheiten war die Notwendigkeit, die Suspension der Protein-G-Sepharose in einem Volumen von 25 µl zu pipetieren. Dies war immer mit einem gewissen Fehler behaftet. Die gemessene Aktivität von etwa 1 pmol ATP h⁻¹ IP⁻¹ (= 2x10⁷ Zellen) war im Vergleich mit anderen Kinasen sehr gering. Bird et al. stellten eine Aktivität von 0,3 pmol min⁻¹ in 5 µl Zellextrakt (= ca. 1x10⁵ Zellen) für die durch IL-1 stimulierbare T⁶⁶⁹-Kinase aus HepG2 fest [11]. Diese Kinaseaktivität war damit um den Faktor 3500 höher als die der rezeptorassoziierten Kinase in EL4-6.1. Allerdings handelte es sich bei der T⁶⁶⁹-Kinase um die Aktivität im gesamten Zellextrakt und nicht um eine gereinigte Form wie im Immunopräzipitat. Aufgrund der geringen enzymatischen Aktivität wurde die Inkubationszeit im Standardtest auf 60 min ausgedehnt, da der Substratumsatz über mindestens zwei Stunden linear anstieg. Der in Anlehnung an Martin et al. [105] durchgeführte Enzymtest mit Auftrennung des Reaktionsgemisches über SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie ließ schon nach 10 min Reaktionszeit eine deutliche Kinaseaktivität erkennen und war damit um einiges empfindlicher als der Enzymtest mit Phosphocellulose-Einheiten. Doch durch eine Verlängerung der Reaktionszeit bei der Phosphocellulose-Methode war eine deutlich meßbare Enzymaktivität nachzuweisen, so daß diese Methode brauchbare Ergebnisse lieferte, und der Vorteil des größeren Probendurchsatzes bei der Phosphocellulose-Methode ausgenutzt werden konnte.

Die Behandlung der Zellen mit IL-1β führte zu einer Stimulierung der rezeptorassoziierten Kinase um den Faktor 4-5. Im Vergleich mit der von Bird et al. beschriebenen T⁶⁶⁹-Kinase war diese Stimulierbarkeit relativ gering. Die Autoren beschreiben einen 12,9-fachen Anstieg der Kinaseaktivität nach maximaler Stimulierung in KB-Zellen [11]. Doch auch hier war immer eine gewisse Grundaktivität zu beobachten.

Die rezeptorassoziierte Kinase zeigte ein breites Temperaturoptimum zwischen 20 und 30°C. Die Aktivität bei einer Reaktionstemperatur von 37°C war etwas geringer, doch handelte es sich hierbei nicht um einen signifikanten Unterschied zu der maximalen Aktivität. Nach Inkubation bei 45°C war die Aktivität auf weniger als 50% der maximalen Aktivität abgesunken. Die Reaktion bei 0°C führte zu 30% des maximalen Substratumsatzes und lag damit noch höher als die Aktivität von Immunopräzipitaten aus nichtstimulierten Zellen. Diese Differenz in der Phosphorylierungsaktivität, die nicht auf nicht-enzymatische Prozesse zurückgeführt werden kann, ist evtl. durch die Handhabung des Enzymtests bedingt, der aus praktischen Gründen nicht im gesamten Ablauf bei 0°C durchgeführt werden konnte. Andererseits ist es möglich, daß die induzierbare Kinase auch bei niedrigen Temperaturen eine gewisse Aktivität entfaltet. Die Lagerung des Proteinkomplexes für eine Stunde bei Temperaturen bis zu 37°C hatte keine signifikanten Aktivitätsverluste im anschließenden Kinasetest zur Folge, Temperaturen ab 39°C führten jedoch zu einem drastischen Aktivitätsabbau. Schon die Lagerung bei 42°C hatte die Enzymaktivität nahezu vollständig zerstört. Der Aktivitätsverlust der Kinase oberhalb von 37°C, der sich schon bei dem Versuch zum Temperaturoptimum der Kinaseaktivität andeutete (siehe oben), wurde in diesem Experiment sehr deutlich. Der Aktivitätsabfall oberhalb von 37°C ist z. T. auf die normale Wärmedenaturierung von Proteinen zurückzuführen; möglicherweise spiegelt die Empfindlichkeit der Kinase gegenüber erhöhten Temperaturen aber auch eine

Destabilisierung des Rezeptorkomplexes bei Erwärmung wider. Einen weiteren Hinweis auf eine Komplexdestabilisierung und dadurch bedingte verminderte Kinaseaktivität lieferte die Empfindlichkeit der Kinase gegenüber NaCl oder Glycerin im Reaktionsgemisch. Salzkonzentrationen oberhalb von 200 mM führten zu einem Aktivitätsverlust, der mit steigendem Salzgehalt kontinuierlich größer wurde. Deutlich wurde diese Salzempfindlichkeit des Proteinkomplexes ebenfalls bei der Durchführung der Immunopräzipitation in Gegenwart von 250 mM NaCl statt der üblichen 100 mM im Lysepuffer. In der nachfolgenden Kinasemessung des Immunopräzipitates konnte keine Aktivität der stimulierten Zellen nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Auch Glycerin im Reaktionsansatz führte zu einer drastischen Verminderung der Kinaseaktivität. Höhere Temperaturen sowie eine erhöhte Salzkonzentration oder Detergenz scheinen somit die Erhaltung eines funktionsfähigen Rezeptorkomplexes oder zumindest die Assoziation der Kinase am Komplex zu beeinträchtigen.

Ein weiterer Ansatz zur Charakterisierung der Kinase im IL-1-RI-Immunopräzipitat war die Markierung mit dem ATP-Analog 5'-Fluorosulfonylbenzoyladenosen (FSBA). Die Sulfonylfluorid-Gruppe dieser Substanz wirkt analog zum terminalen Phosphat von ATP als elektrophiles Agens und kann kovalent mit verschiedenen Aminosäuren, wie z. B. Serin, Tyrosin, Lysin oder Histidin reagieren und so in der ATP-Bindungsstelle von Enzymen binden [28]. Bei der Verwendung von radioaktiv markiertem FSBA ist es auf diese Weise möglich, nach Auftrennung in einem SDS-PAGE das Enzym in einem Autoradiogramm sichtbar zu machen [182, 137]. Von Takata et al. [157] konnte jedoch auch eine Modifikation der S-Adenosylhomocysteinase durch FSBA festgestellt werden, die nicht mit einer kovalenten Bindung des ATP-Analogs an das Enzym einherging. In diesem Fall kam es infolge der FSBA-Inkubation zum Verlust von zwei Sulfhydryl-Gruppen pro Untereinheit des Proteins, der zu einer Inaktivierung des Enzyms führte.

Um optimale Bedingungen für die Inkubation des Immunopräzipitates mit radioaktivem FSBA zu finden, wurden zunächst Versuche zur Hemmwirkung des ATP-Analogs mit nicht radioaktivem FSBA unternommen. Da FSBA nicht in Wasser löslich ist, wurde in Anlehnung an Colman et al. [28] 10% Dimethylformamid (DMF) als Lösungsvermittler eingesetzt. Das Enzym hatte nach einer einstündigen Inkubation in dem Lösungsmittelgemisch etwa 60% seiner Aktivität verloren. Eine längere Inkubation in 10% DMF führte zu weiteren Aktivitätsverlusten; in wässriger Lösung war die Kinase dagegen vergleichsweise stabil. Es war jedoch nicht möglich, die Lösungsmittelkonzentration zu erniedrigen, da sonst eine 2 mmolare Konzentration von FSBA nicht mehr löslich gewesen wäre.

Nach Inkubation des Immunopräzipitates in 200 μ M FSBA (1 h bei Raumtemperatur) hatte die Kinase ca. 70% ihrer Aktivität im Vergleich zu einer entsprechenden Inkubation im Lösungsmittel verloren. Die Erhöhung der FSBA-Konzentration auf 2 mM erbrachte eine Hemmung bis zu ungefähr 20% Restaktivität. Diese verbleibende Aktivität war noch deutlich höher als die Kinaseaktivität im Immunopräzipitat von nichtstimulierten Zellen.

Die Größenordnung der in diesen Versuchen eingesetzten FSBA-Konzentration stimmt mit den Konzentrationen überein, die andere Arbeitsgruppen zur Hemmung verschiedener Enzyme verwendeten. Wyatt & Colman [174] und Annamalai & Colman [3] führten die Versuche zur Hemmung einer Pyruvatkinase mit 2,1-2,5 mM FSBA durch. Zoller & Taylor [182] erreichten eine mehr als 90%ige Hemmung der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase durch Inkubation in 0,91 mM FSBA.

Likos et al. [100] konnten durch die Zugabe von frischem FSBA nach 160 min Inkubation mit 1,1 mM FSBA eine zusätzliche Hemmung der von ihnen untersuchten Pyruvatkinase beobachten und führten dies auf den Abbau oder die Präzipitation von FSBA im Reaktionsgemisch zurück. Die Inaktivierung der am IL-1-Rezeptor assoziierten Kinase ließ sich jedoch weder durch eine längere Inkubationsdauer noch durch den Zusatz von frischem FSBA deutlich verstärken. Der größte Aktivitätsverlust der rezeptorassoziierten Kinase war in den ersten 60 min zu beobachten. Eine längere Inkubation führte nur noch zu einem sehr geringen weiteren Aktivitätsverlust, wobei es sich hierbei wahrscheinlich um eine von FSBA unabhängige Inaktivierung des Enzyms infolge der Lagerung bei Raumtemperatur in 10% DMF handelte. Ein sehr ähnliches Inaktivierungsverhalten beobachteten Zoller & Taylor bei der Behandlung der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Kinase mit 0,91 mM FSBA: nach 60 min war 90% der Ausgangsaktivität gehemmt, im weiteren Zeitverlauf erfolgte ein Aktivitätsverlust, der in der Auftragung der Aktivität gegenüber der Inkubationszeit nahezu parallel mit dem Aktivitätsverlust der Kontrollproben verlief [182].

Die Gegenwart von Mg^{2+} und Mn^{2+} während der Inkubation mit FSBA verminderte den Inaktivierungseffekt in den Versuchen der vorliegenden Arbeit. Annamalai & Colman [3] machten bei Versuchen mit einer Pyruvatkinase eine vergleichbare Beobachtung. Sie unterteilten die Inaktivierung der Pyruvatkinase in drei Ereignisse: eine schnelle durch DTT reaktivierbare Reaktion und zwei langsame Reaktionen, von denen die eine durch DTT rückgängig zu machen war und die andere nicht. Die langsame, durch DTT rückgängig zu machende Reaktion war vollständig durch freies Mg^{2+} zu verhindern. Da es in der vorliegenden Arbeit lediglich darum ging, möglichst optimale Bedingungen für eine Inkubation mit dem radioaktiv markierten FSBA zu finden, wurden ausführliche kinetische Studien, wie sie in der Literatur beschrieben sind [z. B. 100, 3] nicht weiter betrieben.

In allen im Rahmen der vorliegenden Arbeit unternommenen Versuchen zum Einfluß von FSBA war eine Restaktivität von 20% zu festzustellen, die nicht durch FSBA zu hemmen war. Auch Wyatt & Colman [174] konnten in ihren Versuchen mit einer Pyruvatkinase eine nicht zu inaktivierende Enzymaktivität von 20-30% feststellen. Zoller & Taylor hingegen erreichten durch mehrstündige Inkubation mit FSBA eine nahezu vollständige Inaktivierung der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase und konnten durch die Isolierung des markierten Peptids die kovalente Bindung zwischen FSBA und Aminosäure nachweisen [182]. Möglicherweise äußerte sich in der nicht vollständigen Hemmbarkeit der am IL-1-Rezeptor assoziierten Kinase eine nichtkovalente Interaktion von FSBA und Protein.

Nach der Inkubation des IL-1-RI-Immunopräzipitates mit radioaktiv markiertem FSBA konnte keine Proteinbande beobachtet werden, die ausschließlich im Immunopräzipitat der stimulierten Zellen aufgetreten wäre. Die Immunopräzipitate aus unstimulierten und aus stimulierten Zellen zeigten im Autoradiogramm ein gleiches Bandenmuster. Es wäre zu vermuten gewesen, daß eine Markierung der rezeptorassoziierten Kinase mit dem ATP-Analog FSBA von deren Aktivität und somit vom Stimulierungszustand der Zellen abhängig gewesen wäre. Es sind prinzipiell zwei Möglichkeiten der Kinaseaktivierung denkbar: (i) Die Kinase assoziiert infolge der Stimulierung des IL-1-Rezeptors mit dem Rezeptorkomplex und entfaltet hier ihre enzymatische Aktivität. (ii) Die Kinase ist konstitutiv mit dem Rezeptor assoziiert und wird im Verlauf der Stimulierung der Zellen, z.B. durch eine Phosphorylierung, aktiviert. Im ersten Fall hätte es im Immunopräzipitat der nichtstimulierten Zellen keine Markierung der rezeptorassoziierten Kinase

geben können. Im zweiten Fall wäre eine Markierung durch FSBA im Immunopräzipitat nichtstimulierter Zellen möglich, wenn die ATP-Bindungsstelle des Enzyms unabhängig vom Aktivierungszustand zugänglich wäre. Das Ergebnis des FSBA-Markierungsversuches läßt also keine eindeutige Interpretation zu. Es ist möglich, daß sich unter den markierten Proteinbanden eine Kinase befindet. Wenn dies zutrifft, ist die ATP-Bindungsstelle unabhängig vom Aktivierungszustand des Enzyms zugänglich, und das Enzym ist konstitutiv am IL-1-Rezeptor assoziiert. Es ist andererseits auch möglich, daß Enzym und ATP-Analog keine kovalente Bindung eingegangen sind, und es daher nicht zu einer Markierung der Kinase gekommen ist. Die Inkubation mit dem gelabelten FSBA hatte zur Markierung von Banden in den Größen von 25 und 45 kD geführt, eine weitere schwache Markierung war bei etwa 80 kD festzustellen. Bei dem Protein von 80 kD könnte es sich um die von Cao et al. [19] beschriebene, am IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase IRAK handeln. Allerdings machten die Autoren die Beobachtung, daß die Assoziation von IRAK mit dem IL-1-Rezeptorkomplex von einer Stimulierung der Zellen mit IL-1 abhängig ist. Dies konnte für das 80 kD-Protein im Immunopräzipitat aus EL4-6.1 nicht bestätigt werden, denn die durch FSBA-Behandlung markierbare Bande erschien unabhängig von einer vorherigen Stimulierung der Zellen. Es ist also denkbar, daß es sich hierbei um ein anderes ATP-bindendes Protein im IL-1-Rezeptorkomplex handelt, möglicherweise stellt die 80 kD-Bande das Protein Mortalin dar, auf welches weiter unten noch näher eingegangen werden wird.

Die durch FSBA markierte Bande von 25 kD könnte auf ein GTP-bindendes Protein (G-Protein) zurückzuführen sein. Wie in der Einleitung erwähnt, vermuten verschiedene Autoren die Beteiligung von G-Proteinen am IL-1-Signaltransfer [z.B. 129, 38, 16]. G-Proteine stellen einen wichtigen Faktor in dem Übertragungsweg der Adenylat-Cyclase-Kaskade dar, der zu einem erhöhten cAMP-Spiegel und zur Aktivierung einer cAMP-abhängigen Proteinkinase führt [62]. Die G-Proteine, die durch die Natur des gebundenen Nukleotids (GTP oder GDP) reguliert werden, koppeln dabei den Hormonrezeptor mit der Adenylat-Cyclase. Bei diesen G-Proteinen handelt es sich um Heterotrimere, die aus einer α - (45 kD), β - (35 kD) und γ -Untereinheit (7 kD) bestehen. Die α -Untereinheit bindet das Nukleotid und dissoziiert im aktivierten Zustand mit dem gebundenen GTP von der $\beta\gamma$ -Untereinheit und aktiviert die Adenylat-Cyclase [62]. Eine weitere Form der G-Proteine sind die monomeren, ras-ähnlichen Proteine mit einem Molekulargewicht um 21 kD [2]. Mitcham & Sims [114] isolierten ein Protein (IIP1), welches mit dem nichtaktivierten IL-1-Rezeptor assoziiert ist. Die Klonierung dieses Moleküls offenbarte eine GAP-artige Domäne (*GTPase activating protein*), welche eine regulatorische Funktion auf ein GTP-bindendes Protein ausüben könnte [154]. Die Annahme liegt daher nahe, daß G-Proteine im IL-1-Signaltransfer involviert sind. Ob sich mit dem Adenosin-Analog FSBA jedoch auch GTP-bindende Proteine markieren lassen, ist nicht eindeutig zu beantworten, daher lassen sich über die Natur der markierten Proteinbande von 25 kD nur Vermutungen anstellen.

4.2 Komponenten des IL-1-Rezeptorkomplexes

Die Anfärbung der Proteine im IL-1-RI-Immunopräzipitat zeigte neben den Banden des IL-1RI-spezifischen Antikörpers je nach aufgetragener Proteinmenge bis zu zehn weitere Proteinbanden. Durch eine Modifikation der Immunopräzipitation konnte eine deutliche Reduzierung der Banden des Antikörpers erreicht werden.

Die Beobachtung, daß Rezeptoren als multimere Proteinkomplexe zu isolieren sind, wurde schon von verschiedenen Autoren beschrieben [z.B. 49, 85, 156, 146]. Wie in der Einleitung ausgeführt, sind vom IL-1-Rezeptorkomplex bereits verschiedene Komponenten bekannt und in ihrer Funktion untersucht: IL-1RAcP wurde von Greenfeder et al. [67] kloniert, sequenziert und als zweite Untereinheit des IL-1-Rezeptors bezeichnet. Ein weiteres Protein im Rezeptorkomplex ist IIP1 [114], dem eine negativ regulatorische Funktion zugeschrieben wird. IL-1Rrp wurde aufgrund seiner Ähnlichkeit mit IL-1RI und IL-1RAcP in den Zusammenhang mit dem Rezeptorkomplex gestellt [133]. Die rezeptorassoziierte Kinase IRAK ist gereinigt und sequenziert worden [19]. Für das auf den Transkriptionsfaktor NFκB wirkende TRAF6 konnte eine direkte Interaktion mit IRAK nachgewiesen werden [20].

Durch eine Coimmunopräzipitation konnten in dieser Arbeit drei weitere, mit dem IL-1-Rezeptor assoziierte Proteine aminoterminal ansequenziert werden. Von fünf anderen assoziierten Proteinen wurden einige Aminosäuren bestimmt, doch die Sequenziererergebnisse waren nicht eindeutig genug, um eine sinnvolle Proteinsequenz-Datenbanksuche durchführen zu können.

4.2.1 HnRNP

Die aminoterminalen 25 Aminosäuren eines 38 kD großen Proteins aus dem Immunopräzipitat des IL-1-Rezeptors zeigten eine große Ähnlichkeit (76% Identität) mit den humanen Sequenzen von hnRNP A2 und B1 (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*). HnRNP A2 und B1 sind bis auf ein 12 Aminosäuren langes Insert nach der zweiten Aminosäure in B1 identisch [17]. Die aminoterminalen Sequenz des Proteins aus dem IL-1RI-Immunopräzipitat entsprach der Position 33 (A2) bzw. 45 (B1) des hnRNP. Die Molekulargewichte von hnRNP A2 und B1 werden mit 36 und 38 kD [17] bzw. mit 34 und 35 kD [180] angegeben und entsprechen damit in etwa der Größe des Proteins aus dem IL-1RI-Immunopräzipitat (38 kD). Zhou et al. [180] reinigten hnRNP A2 als ein Lungenkrebs-spezifisches Antigen und stellten eine aminoterminal Blockierung des Proteins fest. Nach einem Verdau mit CNBr waren sie in der Lage, interne Peptide zu sequenzieren. Eines der Peptide begann mit der zweiten Aminosäure, die von Burd et al. [17] nach der Sequenz der cDNA abgeleitet worden war. HnRNP A2 besitzt also keine Präsequenz, die im Verlauf der Reifung des Proteins abgespalten werden würde. Demnach könnte es sich bei dem Protein des IL-1-RI-Immunopräzipitates um eine weitere Spleißvariante von hnRNP A2 handeln, als welche auch schon hnRNP B2 beschrieben wurde [89, 180]. In einem Übersichtsartikel beschreiben Dreyfuss et al. [44] die Assoziation von hnRNAs der Vertebraten mit verschiedenen hnRNPs in der Größe von 30 bis 43 kD. Durch alternatives

Spleißen und posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Methylierung und Glycosylierung, wird eine Diversität der Isoformen von hnRNPs erreicht [180]. Die Proteine der A- und B-Gruppe besitzen zwei RNA-Bindungsdomänen sowie eine glycinreiche Domäne im carboxyterminalen Bereich, welche bei Protein-Protein-Interaktionen eine Rolle spielt [17]. Für viele hnRNPs ist eine Lokalisation im Nukleoplasma beobachtet worden [44], Piñol-Roma et al. [135] konnten jedoch ein Pendeln von hnRNP A1 zwischen Cytoplasma und Kern nachweisen. Durch die Bindung an RNA beeinflussen hnRNPs die Struktur der RNA und damit auch die Interaktion der RNA mit weiteren Faktoren. Es wird diesen Proteinen folglich eine Funktion bei der Prozessierung der pre-mRNA zugeschrieben [44]. Viele hnRNPs sind in der Lage, einzelsträngige DNA zu binden [90, 44] und es wird vermutet, daß sie eine Rolle bei der DNA-Replikation, der Rekombination und bei der Transkription spielen.

Die Assoziation eines solchen RNA-bindenden Proteins am IL-1-Rezeptor erscheint vor dem Hintergrund plausibel, daß der IL-1-Rezeptorkomplex nach der Ligandenbindung internalisiert wird [117, 34]. Curtis et al. [34] stellten fest, daß der intakte IL-1-Rezeptorkomplex zum Kern transportiert wird und daß es nicht zu Dissoziation von Ligand und Rezeptor sowie zum lysosomalem Abbau, wie z. B. bei dem EGF-Rezeptor (*epidermal growth factor*) [109], kommt. Die Autoren vermuten, daß der IL-1-Rezeptorkomplex direkt oder indirekt ein Teil des Mechanismus ist, der die IL-1-induzierte Gentranskription reguliert. Die Mitwirkung eines RNA- oder ssDNA-bindenden Proteins an diesen Vorgängen ist somit wahrscheinlich.

4.2.2 TLS/FUS

Die aminoterminal Sequenz eines weiteren, am IL-1-Rezeptor assoziierten Proteins (p67) zeigte eine 96%ige Übereinstimmung mit einem als TLS bezeichneten humanen Protein. Die Sequenz von TLS (*translocated in liposarcoma*) war zunächst im Zusammenhang mit einer tumorspezifischen Translokation t(12;16)(q13;p11) in einem Liposarkom gefunden worden, welche zu einer strukturellen Veränderung des Gens für den Transkriptionsfaktor CHOP führt [33]. Die bis dahin unbekannte Sequenz TLS war durch diese Translokation mit dem 5'-Ende von CHOP fusioniert. Die Klonierung der cDNA für TLS zeigte, daß die Sequenz des gesamten Gens deutlich größer als die in dem Fusionsgen auftretende Sequenz ist. In dem Fusionsgen erschien lediglich die 5'-Hälfte der gesamten Sequenz. Zeitgleich mit Crozat et al. wurde diese Sequenz von einer anderen Gruppe analysiert und als FUS bezeichnet [139]. Aus der cDNA läßt sich ein Protein von 525 AS ableiten, welches carboxyterminal eine RNA-Bindungsdomäne besitzt und immunologisch als ein Protein von 68 kD nachweisbar ist [33]. 1995 wurde das Genprodukt TLS/FUS zusammen mit anderen hnRNPs aus einem Spleißosomenkomplex isoliert und damit als RNA-bindendes Protein identifiziert [18].

Das aminoterminal Peptid des Proteins aus dem IL-1-RI-Immunopräzipitat stimmte ab der Position 353 mit TLS/FUS überein, d. h. der Aminoterminus von p67 setzte im letzten Drittel der Sequenz von TLS/FUS ein. Bei p67 im IL-1-Rezeptorkomplex kann es sich also nicht um das beschriebene TLS/FUS-Genprodukt handeln. Der aminoterminal Beginn des Proteins aus dem Immunopräzipitat korrespondierte mit dem letzten Fünftel der von Crozat et al. beschriebenen RNA-Bindungsdomäne von TLS/FUS [33], daher kann über das RNA-

Bindungsvermögen des ansequenzierten Proteins keine Aussage gemacht werden. Hackl & Lührmann [72] beschreiben neben der RNA-Bindungsdomäne eine Zinkfingerstruktur in TLS/FUS. Die dafür wichtigen Cysteine sind im letzten Drittel von TLS/FUS lokalisiert. Es ist also möglich, daß das ansequenzierte Protein p67 aus dem Immunopräzipitat gleichfalls eines Zinkfingerstruktur ausbildet und damit DNA-Bindungseigenschaften besitzt.

4.2.3 Mortalin

Die aminoterminal Sequenzierung von p74 aus dem Immunopräzipitat ergab eine vollständige Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz des murinen Proteins PBP74 [42]. Auch die Sequenzen von zwei weiteren Peptiden nach tryptischem Verdau des Proteins waren identisch mit der Sequenz von PBP74. In den Bereichen der sequenzierten Peptide von p74 wurde in Anlehnung an die cDNA-Sequenz von Domanico et al. [42] ein Primerpaar gewählt (PBPu1/R1) und eine RT-PCR mit RNA aus EL4-6.1 durchgeführt. Die Sequenzierung des klonierten PCR-Produktes ergab, bis auf eine Base, eine vollständige Übereinstimmung mit der Sequenz von PBP74. Daraufhin wurde, wieder bezogen auf die veröffentlichte Sequenz, ein Primerpaar gewählt, welches die translatierte Region des Proteins umschloß. Nach RT-PCR und Klonierung des PCR-Produktes wurde die gesamte Sequenz sequenziert und die sehr große Ähnlichkeit mit PBP74 bestätigt.

Die cDNA-Sequenz von PBP74 war 1993 von Domanico et al. nach Reinigung, Peptidsequenzierung und cDNA-Klonierung eines peptidbindenden Proteins (PBP74) veröffentlicht worden [42]. Das Protein war aufgrund seiner Eigenschaft, ein Fragment von Cytochrom C zu binden, isoliert und in den Zusammenhang mit der Antigen-Prozessierung gestellt worden. Die Reinigung dieses Proteins war erstmals 1987 erfolgt [93]. 1989 wurde eine immunologische Reaktion von PBP74 mit einem Anti-Hsp70-Antikörper festgestellt [162]. Die Sequenzierung von PBP74 bestätigte, daß es sich bei diesem Protein um ein Mitglied der Hsp70-Familie handelt [42]. Die Sequenz ist den anderen Vertretern dieser Familie (Hsc70, Hsp70 und BiP) sehr ähnlich, war aber bis dahin noch nicht bekannt gewesen. Das Protein besitzt eine Präsequenz von 46 Aminosäuren, die im Laufe der Reifung des Proteins abgespalten wird. Immunohistologische Versuche mit einem Peptidantikörper gegen die 16 aminoterminalen Aminosäuren des reifen Proteins zeigten eine hauptsächliche Lokalisierung von PBP74 in cytoplasmatischen Vesikeln. Das Protein wurde konstitutiv in allen untersuchten Zelltypen exprimiert [42].

Im gleichen Jahr wie Domanico et al. veröffentlichten Wadhwa et al. die cDNA-Sequenz eines 66 kD großen Proteins, welches im Cytosol mortalier Zellen, aber nicht in immortalisierten Zellen zu finden war [166]. Diese Sequenz weist große Ähnlichkeiten mit PBP74 auf. Durch Behandlung von Zellen mit Antikörpern gegen dieses Protein wurden Zellteilungen stimuliert, weshalb die Autoren eine Beteiligung des Proteins an der Seneszenz von Zellen vermuteten und es als Mortalin (Mot-1) bezeichneten. Kurze Zeit später veröffentlichten Wadhwa et al. eine weitere, als mot-2 bezeichnete Sequenz, die sich in zwei Basen von mot-1 unterscheidet. Mot-2 war im Gegensatz zu Mot-1 aus immortalen Zellen isoliert worden und befand sich in diesen Zellen im perinukleären Bereich. Der Unterschied in zwei Positionen der Nukleotidsequenz hat

den Austausch von zwei Aminosäuren zur Folge (V618M und R624G); ansonsten sind Mot-1 und Mot-2 identisch. Die induzierte Expression von Mot-1 in immortalen Zellen, die ausschließlich Mot-2 besitzen, bewirkt die Seneszenz dieser Zellen [167]. Weitere Untersuchungen zeigten, daß es sich bei den Genen *mot-1* und *mot-2* um verschiedene genomische Loci handelt und daß die Unterschiede in *mot-1* und *mot-2* daher nicht auf Mutationen zurückzuführen sind [168].

1993 sequenzierte eine dritte Gruppe eine Sequenz, die weitgehend der Sequenz von PBP74 und Mortalin entspricht [113]. In diesem Fall handelte es sich bei dem Protein um ein Antigen, welches für den Maus-Stamm C3H spezifisch und schon länger als CSA (*C3H strain specific antigen*) bekannt war. Ein Antikörper gegen dieses Protein war als Werkzeug zur zellbiologischen Analyse von chimären Mäusen genutzt worden [91]. Die cDNA-Sequenzierung der Sequenz aus C3H/HeN-Mäusen und aus BALB/c-Mäusen ergab einen Unterschied in zwei AS-Positionen. Eine dieser Aminosäuren (Arg⁶²⁴) in der Sequenz von C3H war für die stammspezifische Immunogenität von CSA verantwortlich. Die immunohistochemische Analyse zeigte eine mitochondriale Lokalisation von CSA [113].

Ein Vergleich der Sequenzen von CSA, PBP74 und Mortalin (Mot-1 und Mot-2) ergibt, daß CSA aus C3H/HeN-Mäusen vollständig mit Mot-1, und CSA aus BALB/c-Mäusen mit Mot-2 übereinstimmt. PBP74 entspricht in den AS-Positionen, wo sich Mot-1 und Mot-2 unterscheiden, Mot-2. An drei weiteren AS-Positionen bestehen jedoch Unterschiede zwischen PBP74 und Mot-2 (R106K, L123I und S522F, siehe auch Tab. 2).

Die Sequenzierung der cDNA des am IL-1-Rezeptor assoziierten p74 offenbarte eine weitgehende Übereinstimmung auf der Ebene der Aminosäuren mit Mot-2. An Position 123 in p74 war jedoch ein Leucin statt eines Isoleucin abzuleiten. Um diesen Unterschied deutlich zu machen, wurde die Sequenz des rezeptorassoziierten Proteins als Mot-3 bezeichnet. Auf Nukleotidebene zeigte sich ein weiterer Unterschied, der jedoch nicht von einem Wechsel einer Aminosäure begleitet war. Isoleucin ist ebenso wie Leucin eine aliphatische Monoaminomonocarbonsäure und es ist daher nicht zu erwarten, daß diese konservative Aminosäuresubstituierung entscheidende Auswirkungen auf die Struktur und Funktion des Proteins hat.

Durch den hohen Grad der Ähnlichkeit der Sequenz von Mortalin/PBP74/CSA mit Vertretern der Hsp70-Familie (Tab. 4) wurde dieses Protein als neuer Vertreter dieser Familie angesprochen [166, 42, 113]. Die Hsp70-Familie in Vertebraten umfaßt damit vier Mitglieder: das durch Streß induzierbare Hsp70 im Cytosol, das konstitutive Hsc70 im Cytosol, das konstitutive BiP/Grp78 im ER und Mortalin/PBP74/CSA, welches gleichfalls konstitutiv in der Zelle vorkommt.

Hsp70-Familie	Identität auf AS-Ebene mit Mortalin/PBP74/CSA
Hsp70 (<i>H. sapiens</i>)	43%
Hsc70 (<i>H. sapiens</i>)	46%
BiP/GRP78 (<i>H. sapiens</i>)	47%
DnaK (<i>E. coli</i>)	54%
SSC1 (<i>S. cerevisiae</i>)	62%

Tabelle 4: Vergleich von Mortalin/PBP74/CSA mit anderen Hsp70-Proteinen auf AS-Ebene [in Anlehnung an 10]

Die allgemein angenommene Funktion von Hitzeschock-Proteinen ist die Beeinflussung der Konformation von anderen Proteinen. Dies kann während der Biosynthese, während der Reifung eines Proteins, beim Proteintransport oder bei der Bildung von oligomeren Proteinkomplexen der Fall sein. Eine weitere Aufgabe wird den Hitzeschock-Proteinen beim Proteinabbau zugeschrieben [59]. Diese Funktionen gehen immer mit der Assoziation an andere Proteine einher und finden unter der Beteiligung von ATP statt. Für den Ablauf dieser Prozesse kommen prinzipiell zwei Denkmöglichkeiten in Frage [59]:

- a) Das Hsp bindet sein Substrat, und durch eine ATP-Hydrolyse findet eine Konformationsänderung im Hitzeschock-Protein statt. Diese wird auf das gebundene Substrat übertragen, so daß eine Faltung des Substratproteins oder eine Interaktion mit anderen Proteinen ermöglicht wird.
- b) In der als *Antifolding*-Funktion umschriebenen Denkmöglichkeit bindet das Hsp sein ungefaltetes Substratprotein, welches nach ATP-Hydrolyse freigesetzt wird. Nun kann sich das Substrat falten oder Wechselwirkungen mit anderen Proteinen eingehen.

Die Mitglieder der Hsp70-Familie zeichnen sich durch die strukturelle Unterteilung in eine aminoterminal ATPase-Domäne und in eine carboxyterminale Substrat- oder Peptidbindungsdomäne aus (siehe Abb. 44). 1990 wurde die dreidimensionale Struktur des ATPase-Fragmentes von Hsc70 aus dem Rind aufgeklärt. Der Kern der ATP-Bindungsstelle offenbart in der Tertiärstruktur Ähnlichkeiten mit der Struktur der Hexokinase [52]. Die Strukturaufklärung der carboxyterminalen Peptidbindungsdomäne wurde erst 1996 veröffentlicht. Hier zeigte sich, daß dieser Teil des Hsp70 (am Beispiel von DnaK, dem Hsp70 aus *E. coli*) aus zwei Teilen besteht. Der erste, aminoterminal Teil bindet das Polypeptid, der zweite Teil bildet eine deckelartige Struktur, die keinen direkten Kontakt mit dem Substrat eingeht. Im ATP-gebundenen Zustand des Moleküls bildet dieser Deckel eine offene Struktur; in diesem Zustand können Peptide leicht binden und dissoziieren. Im ADP-gebundenen Zustand ist der Deckel geschlossen, und der Substrat/Hsp70-Komplex bleibt stabil [181].

In der vorliegenden Arbeit wurde das Mitglied der Hsp70-Familie Mortalin/PBP74/CSA in Assoziation mit dem IL-1-Rezeptor gefunden. Die Sequenzierung des rezeptorassoziierten Proteins fand mit Material der murinen Thymoma-Zelllinie EL4-6.1 statt, doch auch in den anderen untersuchten Zelllinien ECV-304 (humane Endothelzelllinie), HepG2 (humane Lebercarcinom-Zelllinie), Jurkat E6.1 und Würzburg (humane T-Zelllinien) wurde Mortalin immunologisch im IL-1-Rezeptorkomplex nachgewiesen. Die Assoziation dieses Hitzeschock-Proteins am IL-1-Rezeptor ist also nicht auf die T-Zelllinie EL4-6.1 beschränkt.

Die Beobachtung, daß Rezeptoren mit Hitzeschock-Proteinen assoziiert sein können, ist schon verschiedentlich veröffentlicht worden. 1987 isolierten Estes et al. einen Vertreter der Hsp70-Familie zusammen mit dem humanen Progesteronrezeptor durch eine Immunoaffinitäts-Chromatographie mit einem immobilisierten monoklonalen Antikörper gegen den Rezeptor [49]. Kost et al. stellten die Assoziation des Progesteronrezeptors aus dem Huhn mit Hsp90 und mit Hsc70 fest. Durch Behandlung mit 300 mM KCl dissoziierte Hsp90 aus dem Komplex, Hsc70 blieb jedoch assoziiert. Lediglich die Inkubation mit ATP führte zur Dissoziation des Hsc70 vom Rezeptor. Hsc70 und Hsp90 wurden zusammen mit dem nichtaktivierten Rezeptor isoliert. Die Immunisolation des aktivierten Rezeptors zeigte nur die Assoziation von Hsc70, nicht von Hsp90 [85]. Smith et al. konnten sechs Proteine durch eine Immunopräzipitation mit einem monoklonalen Antikörper gegen den Progesteronrezeptor isolieren. Neben dem Rezeptor, Hsp90 und Hsp70 fanden sie Proteine mit Molekulargewichten von 23, 50 und 54 kD. Eine Stimulierung des Rezeptors *in vivo* hatte zur Folge, daß das Auftreten aller rezeptorassoziierten Proteine im Immunopräzipitat, mit Ausnahme von Hsc70, verringert wurde [156]. Auch der unstimulierte Glucocorticoidrezeptor wurde durch eine Immunisolation in Assoziation mit Hsp90 und Hsp70 gefunden. Die Hormonbindung des Rezeptors führte zur Dissoziation von Hsp90, nicht jedoch von Hsp70 [146]. Der Assoziation von Hsp90 an Steroidrezeptoren wird eine sogenannte Platzhalterfunktion zugeschrieben, d. h. das Hsp90 verhindert die Interaktion des Rezeptors mit der DNA. Die Aktivierung des Rezeptors setzt das Hsp90 frei, und der Rezeptor wird dadurch in die Lage versetzt, DNA binden und als Transkriptionsfaktor wirken zu können [138]. Bezüglich der Assoziation von Hsp70 am Glucocorticoidrezeptor vermuten Sanchez et al., daß das Hsp70 in den Transport des Rezeptors aus dem Cytosol in den Kern involviert ist [146]. Der IL-1-Rezeptor ähnelt den Steroidrezeptoren, wie z. B. dem erwähnten Progesteronrezeptor und dem Glucocorticoidrezeptor in der Weise, daß dieser Zytokinrezeptor ebenfalls in den Kern transportiert wird [34]. Es konnte gezeigt werden, daß der IL-1/IL-1RI-Komplex immobilisierte DNA bindet und sich bezüglich einer Elution wie Steroidrezeptoren verhält [170]. Allerdings wird der Ligand IL-1 nicht wie die lipophilen Steroidhormone in die Zelle aufgenommen, sondern bindet an der extrazellulären Domäne seines Rezeptors und wird zusammen mit dem Rezeptor internalisiert [117, 34]. Die Beteiligung eines Vertreters der Hsp70-Familie, in diesem Fall Mortalin, an dem Transport des Rezeptorkomplexes zum und/oder in den Kern ist daher, wie für Steroidrezeptoren, auch für den IL-1-Rezeptor denkbar.

4.3 Der Antikörper gegen Mortalin

Bedingt durch die großen Ähnlichkeiten innerhalb der Hsp70-Familie (siehe Tab. 4) zeigten die zur Verfügung stehenden Antikörper BRM-22 und 3a3 eine Kreuzreaktion zwischen verschiedenen Familienmitgliedern. Aus diesem Grund wurde ein Antikörperserum gegen die letzten 14 Aminosäuren des Carboxyterminus von Mortalin hergestellt. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von den vier Mitgliedern der Hsp70-Familie (Hsp70, Hsc70, BiP/Grp78 und Mortalin/CSA/PBP74) hatte gezeigt, daß im carboxyterminalen Bereich der Proteine nur wenig Ähnlichkeit besteht, und daß der Carboxyterminus daher als spezifisches Antigen geeignet war. In Western-Blots mit dem Antiserum gegen dieses Peptid (Anti-Mot-Serum) konnte in allen untersuchten Zellextrakten jeweils eine Bande bei der für Mortalin erwarteten Größe von 74 kD detektiert werden. Andere Hsp70-spezifische Antikörper zeigten in diesem Bereich bis zu vier Banden.

Durch eine Immunopräzipitation mit dem Anti-Mot-Serum und anschließendem *in vitro*-Kinasetest wurde überprüft, ob die rezeptorassoziierte Kinase IRAK direkt oder indirekt mit Mortalin assoziiert und auf diese Weise zu isolieren war. Das Mortalin-Immunopräzipitat zeigte hohe Kinaseaktivität, die sich in der Phosphorylierung mehrerer endogener Substrate äußerte. Ein gleiches Phosphorylierungsmuster wurde jedoch auch nach Immunopräzipitation mit dem Präserum erhalten. Es handelte sich daher um unspezifische Kinaseaktivitäten, die durch die Serumkomponenten präzipitiert wurden. Um die Kinaseaktivität von IRAK von dieser starken Hintergrundaktivität unterscheiden zu können, wurde im Anschluß an die Immunopräzipitation mit dem Anti-Mot-Serum bzw. dem Präserum (als Kontrolle) mit dem verbleibenden Zellextrakt eine herkömmliche Immunopräzipitation mit dem IL-1-rezeptorspezifischen Antikörper 12A6 durchgeführt und die Phosphorylierungsaktivität analysiert. Mit dieser Methode konnte keine Verringerung der rezeptorassoziierten Kinaseaktivität im nach der Anti-Mot-Immunopräzipitation verbleibenden Zellextrakt nachgewiesen werden. In der nachfolgenden Immunopräzipitation mit 12A6, sowohl nach der Präserum-Immunopräzipitation sowie nach der Anti-Mot-Immunopräzipitation, war die stimulierbare Kinaseaktivität als Phosphorylierung des endogenen Substrates p60 zu erkennen. Das Anti-Mot-Serum war also nicht in der Lage gewesen, die rezeptorassoziierte Kinaseaktivität aus dem Zellextrakt abzutrennen. Dieses Ergebnis läßt sich dadurch erklären, daß wahrscheinlich nur ein geringer Teil des in der gesamten Zelle vorhandenen Mortalins am IL-1-Rezeptor assoziiert ist. Auch Clarke et al. stellten bei ihren Arbeiten zu dem Hsc70/p53-Komplex fest, daß ein Großteil des Hitzeschock-Proteins nicht mit p53 assoziiert war [26]. Das in der Zelle nicht am IL-1-Rezeptor assoziierte Mortalin könnte den größten Teil des für die Immunopräzipitation eingesetzten Antikörpers binden und damit dem rezeptorassoziierten Mortalin, wovon nur relativ wenig in der Zelle vorhanden ist, die Möglichkeit nehmen, immunopräzipitiert zu werden. Weiterhin ist es denkbar, daß durch die Bindung an Substratproteine der Carboxyterminus von Mortalin blockiert, und daher das am IL-1-Rezeptorkomplex assoziierte Hitzeschock-Protein nicht für den Peptidantikörper zugänglich ist.

4.4 Die *in vitro*-Dissoziation von Mortalin

Die Behandlung des IL-1-Rezeptorkomplexes *in vitro* mit ATP führte zur Dissoziation von Mortalin aus dem Komplex. Die Inkubation mit 1 μ M ATP erbrachte bereits eine deutlich sichtbare Dissoziation, der maximale Effekt von 90% Ablösung wurde mit 1 mM ATP erreicht. Die Dissoziation von Mortalin aus dem IL-1-Rezeptorkomplex erfolgte innerhalb weniger Minuten, wobei die Temperatur keinen entscheidenden Einfluß auf die *in vitro*-Dissoziation hatte. Im Hinblick auf das Nukleotid war die *in vitro*-Dissoziation spezifisch für ATP, doch auch GTP zeigte eine schwache Wirkung. Allerdings war selbst eine 10 mmolare GTP-Konzentration nicht so wirkungsvoll wie 1 mM ATP. UTP und CTP führten nicht zur Dissoziation von Mortalin. Auch die Deoxynukleotide dTTP, dGTP und dCTP, das nicht-hydrolysierbare ATP-Analog γ S-ATP sowie cAMP zeigten keine Wirkung, lediglich 1 mM dATP führte zur Ablösung von 30% Mortalin. Die Behandlung mit 1 mM ADP hatte keinen Einfluß auf die *in vitro*-Dissoziation; wurde der Proteinkomplex mit ADP und ATP zusammen inkubiert, kam es zur maximalen Dissoziation.

Clarke et al. beschreiben das Verhalten des am p53-Komplex assoziierten Hsc70 im Hinblick auf eine *in vitro*-Dissoziation [26]. Auch dieses Hitzeschock-Protein löst sich nach Behandlung mit vergleichbaren ATP-Konzentrationen aus dem Proteinkomplex. Eine 0,1 μ molare ATP-Lösung führt nach Inkubation für 10 min auf Eis zur Ablösung von 30% des Hsc70 im Vergleich zu 15%, die sich bei gleicher Behandlung ohne ATP ablösen. Eine 10 μ molare Lösung bewirkt die Freisetzung von 60% Hsc70. Die Ergebnisse von Clarke et al. lassen eine stärkere Temperaturabhängigkeit der Dissoziation vermuten als es für die Dissoziation von Mortalin aus dem IL-1-Rezeptorkomplex zu beobachten gewesen war. Die Inkubation für 10 min auf Eis mit 10 μ M ATP führte zur Freisetzung von 60% Hsc70 aus dem p53-Komplex, nach 30 min bei RT mit 1 mM ATP löste sich mehr als 95% [26]. Allerdings wurden bei diesen Versuchen keine vergleichbaren ATP-Konzentrationen und Inkubationszeiten eingesetzt, so daß die Ergebnisse schwer zu interpretieren sind.

Die *in vitro*-Dissoziation von Mortalin auch bei niedrigen Temperaturen, die in den Versuchen der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde, deutet darauf hin, daß es sich bei dieser Reaktion wahrscheinlich nicht um einen enzymatischen Prozeß, d. h. nicht um eine ATP-Hydrolyse handelt. Palleros et al. untersuchten die Interaktion von DnaK (ein Hsp70-Homolog aus *E. coli*) mit denaturierten Proteinen und stellten fest, daß die Bindung von ATP, aber nicht die ATP-Hydrolyse für eine Dissoziation notwendig ist. Durch Messung von Tryptophan-Fluoreszenz-Emissionsspektren konnten sie eine Konformationsänderung nach der Bindung von ATP, jedoch nicht nach Bindung von ADP oder γ S-ATP nachweisen. Diese Konformationsänderung des Hitzeschock-Proteins nach ATP-Bindung könnte die Dissoziation vom Substratprotein bewirken [131]. Eine vergleichbare Konformationsänderung nach ATP-Bindung ist auch für Mortalin denkbar.

Die beobachtete ATP-Spezifität der *in vitro*-Dissoziation von Mortalin wurde für das Dissoziationsverhalten von anderen Hitzeschock-Proteinen gleichfalls festgestellt. Clarke et al. beschreiben für die Dissoziation von Hsc70 aus dem p53-Komplex eine hohe ATP-Spezifität: GTP und CTP zeigten geringe Effekte; mit dATP, ADP und γ S-ATP konnte keine Dissoziation erreicht werden [26]. Palleros et al. stellten für die Dissoziation von DnaK von Proteinsubstraten ebenfalls eine Spezifität für ATP fest und zeigten, daß AMP, ADP und γ S-ATP keine Wirkung haben [131]. Die *in vitro*-Dissoziation von DnaK wird durch ADP gehemmt: durch gleichzeitige

Inkubation des Komplexes mit ATP und ADP wurde ein geringerer Dissoziationseffekt als mit ATP allein erzielt [132]. Diese Beobachtung konnte jedoch für die Dissoziation von Mortalin aus dem IL-1-Rezeptorkomplex nicht bestätigt werden.

Die ATP-Konzentration in der Zelle bewegt sich bei 1-5 mM [99]. Es ist also davon auszugehen, daß unter "normalen" Bedingungen Mortalin nicht mit seinem Substrat assoziiert ist und daß die Bindung des Substrates der aktive Prozeß ist.

Um den Einfluß des am IL-1-Rezeptorkomplex assoziierten Mortalins auf die Aktivität der am Rezeptor assoziierten Kinase IRAK zu testen, wurde das Immunpräzipitat 10 min auf Eis mit ATP behandelt und nach mehreren Waschgängen der *in vitro*-Kinasetest durchgeführt. Eine Kontrolle zeigte, daß schon während der Inkubation mit ATP auf Eis und der nachfolgenden Waschschrte ein Teil des endogenen Substrates p60 durch IRAK phosphoryliert wurde. Dies ist jedoch wahrscheinlich nicht auf eine enzymatische Aktivität bei 0°C, sondern auf Phosphorylierungsaktivitäten während der Waschschrte zurückzuführen, die nicht vollständig gekühlt durchgeführt werden konnten. Die mehrfachen Waschschrte waren notwendig, um das nichtradioaktive ATP zu entfernen, welches sonst zu einer Verringerung der spezifischen Radioaktivität im Kinasetest geführt hätte. Nach ausreichendem Waschen nach der Dissoziation von Mortalin wurde durch die unveränderte Phosphorylierung der exogenen Substrate MBP und H1 deutlich, daß die Aktivität der rezeptorassoziierten Kinase unabhängig von einer Assoziation von Mortalin am Rezeptorkomplex war. Eine direkte Interaktion von Mortalin und Kinase ist also unwahrscheinlich.

Es ist möglich, daß Mortalin seine Funktion während der Stimulierung des Rezeptors erfüllt, indem es an dem Aufbau und der Aktivierung des Rezeptorkomplexes beteiligt ist. Anschließend ist Mortalin für den Komplex und somit auch für die Aktivität der rezeptorassoziierten Kinase nicht mehr von Bedeutung. Allerdings wäre es in diesem Fall nicht stimmig, daß Mortalin auch nach erfolgter Aktivierung noch mit dem Rezeptorkomplex assoziiert ist, da die Assoziation und nicht die Dissoziation der aktive Prozeß ist, wie oben erwähnt wurde. Wahrscheinlicher ist daher, daß Mortalin an der Internalisierung des Rezeptorkomplexes beteiligt ist, die evtl. unabhängig von der Kinaseaktivierung ist.

Wenn es sich bei der Aktivierung der rezeptorassoziierten Kinase und den Vorgängen, die mit Mortalin in Zusammenhang stehen, um getrennte Signaltransduktionswege handelt, ist es zu erklären, daß von fünf untersuchten Zelllinien, die alle in verschiedener Weise auf IL-1 reagieren können, nur bei zweien eine induzierbare rezeptorassoziierte Kinase nachzuweisen war, aber in allen Fällen Mortalin am IL-1-Rezeptor assoziiert ist.

Die angestellten Betrachtungen legen nahe, daß Mortalin an den Prozessen beteiligt ist, die nach Stimulierung der Zellen durch IL-1 mit der Internalisierung des Rezeptorkomplexes und einer Regulation der Genexpression einhergehen. Beispiele für eine transkriptionale Aktivierung durch IL-1, an der der Transkriptionsfaktor NFκB beteiligt ist, sind die Expression von Adhäsionsmolekülen [z. B. 118] oder die Expression von Interleukin-6 [z. B. 151]. Diese Vorgänge stehen mit der von Mizel et al. [117] und Curtis et al. [34] belegten Internalisierung des IL-1-Rezeptorkomplexes und dessen Beteiligung an der Transkriptionskontrolle in Zusammenhang. Wahrscheinlich sind auch die anderen beiden ansequenzierten Proteine des Rezeptorkomplexes (p38 und p67, siehe oben), die in einem Fall sehr sicher und im anderen Fall wahrscheinlich RNA- bzw. DNA-Bindungskapazitäten besitzen, direkt an der Regulation

der Transkriptionsaktivität beteiligt. Die Tatsache, daß ein hochmolekularer Proteinkomplex durch die Zelle bis zum Kern geleitet werden muß, macht die Notwendigkeit von verschiedenen Hilfsfaktoren deutlich. Die Beteiligung von Hitzeschock-Proteinen an Transportvorgängen ist schon mehrfach gezeigt worden [z.B. 37, 23, 80, 150, 165] und daher ist es naheliegend, daß Mortalin im Fall des IL-1-Rezeptorkomplexes an der Translokation des Rezeptors von der Zellmembran zum Kern beteiligt ist. Dieser Prozeß ist ATP-abhängig, denn wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, wird die Assoziation und die Dissoziation von Mortalin mit seinem Proteinsubstrat *in vitro* und wahrscheinlich auch *in vivo* durch ATP reguliert.

4.5 Der Versuch einer funktionellen Analyse von Mortalin

Um die Funktion von Mortalin im IL-1-Signaltransfer genauer zu untersuchen, wurde mit molekularbiologischen Methoden gearbeitet. Durch einen *Sense/Antisense*-Ansatz und einen *Dominant/Negative*-Ansatz sollte die Expression bzw. die Funktionsfähigkeit von Mortalin in der Zelle eingeschränkt werden. Durch Analyse der Reaktionen der Zelle nach IL-1-Stimulierung sollten somit Rückschlüsse auf die Funktion von Mortalin im Signaltransfargeschehen gezogen werden.

Wie oben ausgeführt, besteht die hypothetische Funktion von Mortalin in der Beteiligung an den Translokationsvorgängen des aktivierten IL-1-Rezeptorkomplexes von der Zellmembran zum Kern. Es war daher sinnvoll, ein Modell für diese Versuche einzusetzen, das erstens auf eine Stimulierung mit IL-1 eine Reaktion zeigt, die mit einer IL-1-abhängigen Transkriptionsregulation einhergeht und zweitens für Transfektionsversuche geeignet ist. Die humane Endothelzelllinie ECV-304, die auf Stimulierung mit IL-1 mit der Expression von ICAM-1 reagiert, erschien für diesen Zweck dienlich.

Zytokine sind an der Rekrutierung von Leukozyten an verletzte Gewebestellen oder an Entzündungsherde entscheidend beteiligt. Durch IL-1 wird die Expression der Zelloberflächenmoleküle ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*) und VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*) in Endothelzellen induziert, wodurch die Adhäsion von Leukozyten an die Endothelzellen ermöglicht wird. Die Expression der Adhäsionsmoleküle wird auf transkriptioneller Ebene unter Mitwirkung des Transkriptionsfaktors NFκB reguliert [27]. Nach Angaben von B. Friedrichs (DIfE, Potsdam-Rehbrücke) exprimiert ECV-304 nach mehrstündiger Behandlung mit IL-1β ICAM-1. Der Nachweis dieses Adhäsionsmoleküls konnte in Anlehnung an eine Methode von B. Friedrichs mit entsprechenden Antikörpern und Fluoreszenzdetektion durchgeführt werden. Nach der Stimulierung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von IL-1 über 24 h zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit der Expression von ICAM-1. Die nichtstimulierten Zellen zeigten eine gewisse Grundexpression, die durch Behandlung mit IL-1 (0,01-10 ng IL-1/ml) um das 5-6-fache gesteigert werden konnte.

Um bei der Analyse der stabil transfizierten Zellklone transfektionsbedingte Effekte ausschließen zu können, wurde eine Zelllinie als Kontrolle eingesetzt, die mit dem "leeren" Expressionsvektor (pcDNA3) transfiziert worden war.

4.5.1 Der Sense/Antisense-Ansatz

1978 wurde zum ersten Mal eine Hemmung der Translation durch den Einsatz von komplementären Nukleinsäuren *in vitro* beschrieben [177]. Zur Erklärung dieses Phänomens sind verschiedene Mechanismen denkbar:

- Durch Bindung des Oligonukleotids an die Prä-mRNA im Kern kann die Prozessierung und/oder der nukleocytoplasmatische Transport der RNA gestört werden [96].
- Das Oligonukleotid in *Antisense*-Orientierung bindet an die mRNA, so daß eine Bindung von Ribosomen physikalisch behindert wird.
- Das Oligonukleotid interagiert mit dem 5'-Cap der Zielsequenz und verhindert damit die Bindung von Translationsinitiationsfaktoren.
- Die Duplex von DNA/RNA oder RNA/RNA wird durch spezifische Ribonukleasen sehr schnell abgebaut und die mRNA steht daher für eine Translation nicht mehr zur Verfügung [148].

Ein großes Problem bei dem Einsatz von *Antisense*-Oligonukleotiden *in vivo* ist deren geringe Stabilität in zellulären Systemen. Durch Modifikationen der Oligomere (Phosphorthionate, Methylphosphonate) kann die Resistenz gegenüber der intrazellulären Degradation jedoch erhöht werden [104, 148, 60]. Eine weitere Schwierigkeit ist das Einbringen der großen, negativ geladenen Moleküle in die Zelle [104]. Diese Probleme können durch den Einsatz von transgenen Organismen, die die *Antisense*-RNA *in vivo* transkribieren, umgangen werden. Diese nukleäre Expression von *Antisense*-RNA wurde beispielsweise erfolgreich zur Verminderung des Levels von Interferon- γ eingesetzt. Mehr als die Hälfte der analysierten Klone, die die cDNA von Interferon- γ in *Antisense*-Orientierung integriert hatten, zeigten durchschnittlich eine um mehr als 90% verminderte Expression von Interferon- γ [14]. Ein Nachteil bei der Verwendung von transgenen Zellen ist, daß, bedingt durch den Zeitaufwand, die Möglichkeit begrenzt ist, verschiedene *Antisense*-RNAs bezüglich ihres Einflusses auf die Expression des Zielproteins zu untersuchen. Eine effektive *Antisense*-Sequenz ist nach wie vor nicht eindeutig vorherzusagen und muß durch Experimente getestet werden. Oligonukleotide gegen die Initiationsregion der mRNA sind bereits mit Erfolg eingesetzt worden; auch Sequenzen, die komplementär zu Bereichen nahe des 5'-Endes der Zielsequenz waren, waren erfolgreich [60]. Um die Expression von Mortalin in der Endothelzelllinie ECV-304 zu vermindern, wurde etwa 1/5 der humanen Sequenz nahe dem 5'-Ende der mRNA von Mortalin in *Antisense*-Orientierung unter der konstitutiven Kontrolle des CMV-Promotors in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3 eingesetzt. Durch eine Lipotransfektion wurde ECV-304 mit diesem Konstrukt transfiziert. Zellen, die die DNA stabil in das Genom integriert hatten, wurden auf ihre Neomycinresistenz hin selektioniert. Es wurden 14 Einzelzellklone isoliert und mit einer strangspezifischen Hybridisierungsprobe gegen die *Antisense*-RNA in Northern-Blots analysiert. Die Hybridisierungsprobe zeigte eine unspezifische Reaktion mit einer Bande um 1300 bp bei allen Klonen, die auf die Vektor-DNA zurückzuführen ist, denn auch die RNA der Kontrollzelllinie, die mit dem leeren Vektor transfiziert worden war, wies diese Bande auf. Die nichttransfizierte Zelllinie ECV-304 zeigte diese Bande nicht. Bei sieben der 14 Klone hybridisierte eine Bande von 800 bp mit der strangspezifischen *Antisense*-Probe, bei fünf dieser Klone trat eine zusätzliche Bande um 3000 bp auf. Diese beiden Banden waren weder bei der

Kontrollzelle noch bei der nichttransfizierten Zelle ECV-304 zu beobachten. Es mußte sich demnach um Banden handeln, die auf eine Integration der *Antisense*-DNA zurückzuführen sind. Die Bande von 3000 bp entspricht der Größe der RNA des endogenen Mortalins, doch da die Hybridisierungsprobe für den *Antisense*-Strang spezifisch war, konnte es sich hierbei nicht um die endogene mRNA handeln.

Um die *Antisense*-spezifischen Banden im Northern-Blot deutlich sehen zu können, mußte sehr viel RNA aufgetragen und relativ lange exponiert werden. Der Level der endogenen mRNA für Mortalin war wesentlich höher. Die entsprechende Bande bei 3000 bp konnte mit vierfach weniger RNA und einer etwa zehnfach kürzeren Expositionsdauer nachgewiesen werden. Hierbei muß jedoch berücksichtigt werden, daß in diesen Northern-Blots verschiedene Hybridisierungsproben eingesetzt werden mußten, deren Affinitäten zu den entsprechenden RNA-Banden u. U. differieren können. Daher sind die Intensitäten der Banden nicht direkt zu vergleichen.

Die Expression von Mortalin auf Proteinebene in den Klonen mit integrierter *Antisense*-DNA unterschied sich nicht von der nichttransfizierten Zellen, wie durch Färbung der Proteine in den IL-1RI-Immunopräzipitaten der Klone deutlich wurde. Von einigen Klonen wurde die IL-1-abhängige ICAM-Expression mehrfach gemessen. Dabei zeigte sich bei mehreren Klonen eine signifikante, bis zu 50% niedrigere Expression von ICAM-1, die jeweils mindestens zweimal zu reproduzieren war. Nach 2-3 Wochen Kultivierungszeit allerdings waren diese Klone in ihrer ICAM-Expression nicht mehr von der Kontrollzelle zu unterscheiden. Außerdem korrelierte die anfangs beobachtete, verringerte ICAM-Induzierbarkeit nicht mit dem Auftreten der *Antisense*-spezifischen RNA-Banden.

Da die *Antisense*-RNA nicht zu einer verminderten Expression des endogenen Mortalins in der Zelle geführt hatte und keine Korrelation der IL-1-abhängigen ICAM-Expression mit *Antisense*-spezifischen RNA-Banden festzustellen war, muß davon ausgegangen werden, daß es sich bei den gemessenen Wirkungen um unspezifische, durch die Transfektion bedingte, klonale Effekte handelte. Mit den Ergebnissen des *Sense/Antisense*-Ansatzes können also keine weiteren Aussagen zur Funktion von Mortalin im IL-1-Signaltransfer gemacht werden.

Theoretisch ist für einen deutlichen *Antisense*-Effekt ein annähernd ausgeglichenes Verhältnis von *Sense*- und *Antisense*-RNA notwendig, da die beiden Stränge physikalisch interagieren müssen. Die Menge der *Antisense*-RNA für Mortalin war in den verschiedenen Klonen um ein Vielfaches geringer als die der endogenen mRNA für Mortalin, daher ist es nicht sehr verwunderlich, daß keine spezifischen Effekte zu beobachten waren. Es stellt sich jedoch die Frage, warum die Transkriptionsrate der *Antisense*-RNA so gering war. Die *Antisense*-Sequenz war im Vektor pcDNA3 unter die Kontrolle des CMV-Promotors gestellt worden. Dieser Promotor zeichnet sich in eukaryontischen Zellen durch eine sehr hohe Transkriptionsrate aus. Diese vom Hersteller gemachte Angabe konnte in Versuchen mit anderen Konstrukten (siehe *Dominant/Negative*-Ansatz) durchaus bestätigt werden. Hier war die Transkriptionsrate der Fremd-DNA unter dem CMV-Promotor deutlich höher als die des endogenen Mortalins. Möglicherweise liegt der Grund für den geringen Level der *Antisense*-RNA im Northern-Blot an der geringen Stabilität dieser RNA-Spezies. Wie oben schon erwähnt, ist ein denkbarer Wirkungsmechanismus des *Sense/Antisense*-Ansatzes eine durch endogene Ribonukleasen bedingte Instabilität der *Sense/Antisense*-RNA-Duplices. Wenn ein großer Teil der

transkribierten *Antisense*-RNA sofort mit der endogenen mRNA komplementiert und daraufhin in der Zelle abgebaut wird, läßt sich die *Antisense*-RNA im Northern-Blot nicht mehr nachweisen. Wenn dies tatsächlich der Fall gewesen wäre, wäre die *Antisense*-RNA bezüglich ihres Hybridisierungsvermögens mit der *Sense*-RNA sehr effektiv gewesen, und es hätte eine deutliche Verminderung in der Translationsrate von Mortalin beobachtet werden müssen. Diese Wirkung auf die Translation konnte jedoch nicht festgestellt werden. Wahrscheinlicher ist, daß die Transkriptionsrate der *Antisense*-RNA in den Klonen trotz des starken Promotors wirklich sehr gering war. Da der Promotor mit anderen Sequenzen in der gleichen Zelllinie sehr aktiv war, ist auszuschließen, daß ein Defekt in der Promotorregion vorhanden war. Es muß sich also um einen Kompensationsmechanismus der Zelle handeln, der die Synthese von viel *Antisense*-RNA verhindert. Scanlon et al. beschreiben in einem Übersichtsartikel, daß häufig ein langsamer Verlust des *Antisense*-Effektes bei längerer Dauer der Zellkultivierung zu beobachten ist, der durch Kompensationsmechanismen der Zelle erklärt werden kann [148]. Diese Mechanismen scheinen auch in den Versuchen der vorliegenden Arbeit gewirkt zu haben. Entweder setzte die Gegenregulation der Zelle während der Expansionszeit der Klone ein (etwa zwei Monate), oder Zellen mit hoher Transkriptionsrate der Mortalin-*Antisense*-RNA waren von Anfang an nicht lebensfähig. Dies würde bedeuten, daß Mortalin in der Zelle eine essentielle Funktion erfüllt. Die Deletationsmutation von SSC1, einem homologen Hsp70 aus *Sacharromyces cerevisiae*, ist lethal [30]. Die große Ähnlichkeit zwischen SSC1 und Mortalin (62% Identität auf Aminosäureebene) läßt entsprechendes für Mortalin erwarten. Hightower & Li vermuten, daß Hsc70 in Säugerzellen lebenswichtig ist, da NIH 3T3-Zellen, die Hsc70-*Antisense*-RNA exprimierten, bei Serumentzug schneller starben als die Kontrollzellen [75]. Li & Hightower setzten daher ein Dexamethason (DEX)-induzierbares *Antisense*-RNA-Expressionssystem ein, um den Level von Hsc70 in NIH 3T3-Zellen zu vermindern. Sowohl in den nichtinduzierten als auch in den mit DEX induzierten Zellen konnten die Autoren *Antisense*-spezifische RNA nachweisen. Bei einem Klon wurde durch die Induktion des Promotors die Expression der *Antisense*-RNA etwas verstärkt. Der Level der endogenen mRNA für Hsc70 war jedoch wesentlich höher als der der *Antisense*-RNA und wurde nicht durch die *Antisense*-RNA beeinflusst. Auch auf Proteinebene wurde keine Verminderung von Hsc70 festgestellt. Es kam sogar zu einer leichten Verstärkung der Expression von Hsc70, was von den Autoren auf Kompensationsmechanismen der Zelle zurückgeführt wurde [98]. Die Ergebnisse der verschiedenen Autoren geben Hinweise auf lebenswichtige Funktionen von dem Hsp70-Homolog SSC1 in der Hefe und Hsc70 in Säugerzellen, daher ist es nicht unwahrscheinlich, daß auch Mortalin als Mitglied der Hsp70-Familie essentiell für die Zelle ist und deshalb der *Sense*/*Antisense*-Ansatz nicht den gewünschten Erfolg hatte.

4.5.2 Der Dominant/Negative-Ansatz

Ein weiterer Ansatz, die Funktion von Mortalin zu analysieren, war die Überexpression der einzelnen Domänen des Proteins. Wie unter 3.7 näher ausgeführt, läßt sich das Protein Mortalin in eine aminoterminal ATPase-Domäne, die etwa 2/3 des Proteins ausmacht, und in eine carboxyterminale Substraterkennungsdomäne unterteilen. Diese Domänenstruktur wurde aus

Homologiestudien mit anderen Hsp70-Familienmitglieder hergeleitet. Die ATPase-Domäne ist bei allen Hsp70 hochkonserviert, wohingegen die Substraterkennungsdomäne bei den verschiedenen Proteinen wesentlich variabler ist [10].

Eine am Carboxyterminus deletierte Form des Hsc70 aus der Ratte ist in *E. coli* als 60 kD großes Protein exprimiert worden und erwies sich bezüglich der ATPase-Aktivität als funktionelles Protein [161]. Ein 18 kD großes Fragment aus dem carboxyterminalen Teil von Hsc70 wurde ebenfalls exprimiert und zeigte gleiche Peptidbindungs-Eigenschaften wie das native Protein [169]. Diese Versuche zeigen, daß es prinzipiell möglich ist, die einzelnen Domänen eines Hsp70 mit ihren funktionellen Eigenschaften isoliert zu exprimieren.

Der *Dominant/Negative*-Effekt beruht auf der Beobachtung, daß natürlich vorkommende *Missense*-Mutationen, die die Tyrosinkinase-Domäne des Insulinrezeptors betreffen, in Patienten, die diese Mutation heterozygot in einem Allel tragen, stärkere klinische Symptome hervorrufen, als es von einer 50%igen Reduktion der Zahl funktionsfähiger Insulinrezeptoren zu erwarten wäre. Für diesen Fall wird eine dominant-negative Inhibierung des Produktes des normalen Allels durch das Produkt des mutierten Allels angenommen [zusammengefaßt in 158]. Wie zuerst für den EGF-Rezeptor gezeigt wurde, induziert der Ligand eine Dimerisierung. Diese Dimerisierung führt zur Aktivierung einer rezeptorintrinsischen Tyrosinkinase [176]. Daraufhin wird der Rezeptor durch einen Transphosphorylierungsmechanismus phosphoryliert, wobei sich die Untereinheiten des Dimers gegenseitig phosphorylieren [94]. Wenn ein normaler Rezeptor mit einer Kinase-negativen Rezeptormutante dimerisiert, kann keine Transphosphorylierung stattfinden, und die Signalweiterleitung ist gestört [81].

Die Idee bei der Überexpression der Substraterkennungsdomäne von Mortalin war, daß das in der ATP-Bindung defekte Protein sein Substrat im IL-1-Rezeptorkomplex binden kann, aber durch die fehlende ATP-Funktion kein Signaltransfer stattfindet, und der Komplex blockiert wird. Entsprechendes ist für eine überexprimierte ATPase-Domäne vorstellbar.

Zur Herstellung des Plasmids für die Überexpression der ATPase-Domäne wurde 3/4 der cDNA vom 5'-Ende, den Translationsstartpunkt eingeschlossen, in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3 unter der Kontrolle des CMV-Promotors in *Sense*-Orientierung eingebaut. Für die Substraterkennungsdomäne wurde die 3'-Hälfte der cDNA in den Vektor pcDNA3 in *Sense*-Orientierung integriert. Die Einbringung der Plasmid-DNA für die ATPase-Domäne sowie für die Substraterkennungsdomäne in ECV-304 erfolgte durch Elektroporationen. Klone, die die auf dem Plasmid codierte Neomycinresistenz stabil exprimierten, wurden selektioniert und expandiert. Es wurden insgesamt 30 Klone mit integrierter ATPase-Domänen-DNA und 11 Klone mit integrierter Substraterkennungsdomänen-DNA isoliert.

Die RNA aller Klone zeigte im Northern-Blot eine Bande um 3000 bp, die mit der Probe für die ATPase-Domäne bzw. mit der Probe für die Substraterkennungsdomäne hybridisierte. Diese Bande war ebenfalls in der Wildtyp-Zelllinie ECV-304 und in der Kontrollzelllinie ECV/V2 vorhanden. Es handelte sich demnach um die mRNA für das endogene Mortalin. Die Größe von 3000 bp für die mRNA von Mortalin wurde bereits von Wadhwa et al. beschrieben [166]. Domanico et al. beobachteten ein Transkript von 3,2 und ein wesentlich schwächeres Transkript von 2,6 kb für das hier als PBP74 bezeichnete Protein [42]. Diese Bande von 2,6 kb wurde ebenfalls in den Northern-Blots mit den Hybridisierungsproben für die ATPase-Domäne und für die Substraterkennungsdomäne in der vorliegenden Arbeit beobachtet. Sie war wesentlich

schwächer als die Bande um 3000 bp und das Verhältnis der beiden Banden in den Northern-Blots ist mit den von Domanico et al. gezeigten Ergebnissen vergleichbar. Die cDNA von Mortalin enthält zwei mögliche Polyadenylierungsstellen, so daß es daher zur Bildung von zwei unterschiedlich langen Transkripten kommen kann [42, 113]. Eine weitere Bande um 4,8 kb hybridisierte mit der Probe für die ATPase-Domäne. Die Größe dieser RNA-Spezies und die relativ breite und diffuse Erscheinungsform der Bande deuten darauf hin, daß es sich hierbei um eine unspezifische Hybridisierung mit der 28S-rRNA handelte.

Vier der 11 Substraterkennungsdomänen-Klone zeigten eine Bande um 1300 bp, die auf die integrierte Substraterkennungsdomänen-DNA zurückzuführen war. Bei einem dieser Klone war die Expression der Substraterkennungsdomänen-RNA sehr schwach. Ein Klon zeigte diese RNA in vergleichbarer Intensität wie die endogene mRNA für Mortalin, und zwei Klone exprimierten die RNA für die Substraterkennungsdomäne etwa dreifach stärker als das endogene Mortalin-Transkript.

Von den 30 Klonen, die mit dem Konstrukt für die ATPase-Domäne stabil transfiziert worden waren, zeigten fünf Klone eine Bande von 2 kb, die spezifisch mit der Probe für die ATPase-Domäne hybridisierte. In einem Fall wurde diese RNA in etwa der gleichen Menge wie die endogene mRNA für Mortalin transkribiert, in den anderen vier Klonen trat das Transkript der Fremd-DNA 2-10 mal so stark wie die mRNA für Mortalin auf.

Trotz der sehr hohen Transkriptionsraten der Fremd-DNA konnte in einer Silbernitrat-Färbung der Zellextrakte der verschiedenen Klone kein entsprechendes Translationsprodukt nachgewiesen werden. Auch der immunologische Nachweis mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern ließ keine auf die Fremd-DNA zurückzuführenden Proteinbanden erkennen. Dies galt sowohl für die Klone mit integrierter Substraterkennungsdomäne als auch für die Klone mit ATPase-Domäne. Über die Epitope der Antikörper 3a3 und BRM-22 ist nichts bekannt, doch zumindest der Anti-Mot-Antikörper hätte im Western-Blot die Substraterkennungsdomäne erkennen müssen, da das Peptidantigen dieses polyklonalen Antikörpers auf der DNA für die Substraterkennungsdomäne codiert war. Es ist also davon auszugehen, daß die in den Klonen integrierte Fremd-DNA für die Substraterkennungsdomäne bzw. für die ATPase-Domäne zwar stark transkribiert, jedoch nicht translatiert wurde.

Um ausschließen zu können, daß während der Herstellung der Konstrukte eine Mutation eingetreten war, die zu einem Abbruch der Translation oder zu einem Falscheinbau von Aminosäuren geführt hätte, waren die Insertionsbereiche der Plasmide für beide Domänen vollständig sequenziert worden. Dabei hatte sich herausgestellt, daß beide Konstrukte korrekt waren. Durch das Ergebnis einer Northern-Hybridisierung von RNA-Proben der ECV/ATP-Klone, die zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert worden waren, kann ausgeschlossen werden, daß sich die hohe Transkriptionsrate der Fremd-DNA im Verlauf der Kultivierungszeit der Zellen veränderte.

Zwei wichtige Faktoren, die die Translation bei Eukaryonten beeinflussen, sind die Primärsequenz, die das Startcodon AUG flankiert sowie die Sekundärstruktur der RNA [88]. Die Konsensus-Sequenz für eine optimale Initiation lautet GCCA(oder G)CCAUGG. Besonders wichtig ist das Purin A oder G in Pos. -3 (d.h. drei Nukleotide *upstream* vom Startcodon AUG) und das C in Pos. -1 und -2. Auch die Pos. +4 mit G hat einen dominanten Effekt. Es besitzen jedoch nur 5% der eukaryontischen mRNAs diese perfekte Konsensus-Sequenz [87]. Die Umgebung des Startcodons der ATPase-Domäne von Mortalin wies bis auf die Pos. +4 (A statt G) die von Kozak beschriebene Konsensus-Sequenz auf. Von diesem Gesichtspunkt her waren

für die Initiation der Translation der ATPase-Domäne sehr gute Bedingungen gegeben. Der Beginn des Startcodons für das Konstrukt der Substraterkennungsdomäne befand sich in Pos. 1108 der Sequenz von Mortalin (siehe Abb. 58). Auch hier war die sehr wichtige Position -3, wie von Kozak [87] für eine effiziente Initiation gefordert, mit G besetzt. An Pos. -2 befand sich wie in der Konsensus-Sequenz ein C. Die anderen Positionen, bis auf das Startcodon, entsprachen allerdings nicht der Konsensus-Sequenz. Da aber die dominante Pos. -3 richtig besetzt war, sollte die Translation der Substraterkennungsdomäne prinzipiell möglich sein. Ein anderer wichtiger Punkt ist die Sekundärstruktur der RNA um den Translationsstartpunkt herum. Die Eintrittsstelle für das Ribosom ist das 5'-Ende des Transkriptes. Wenn die 40S-Ribosomenuntereinheit zusammen mit den Faktoren des Initiationskomplexes die mRNA gebunden hat, wandert sie linear die RNA bis zum Startcodon entlang, wo die ribosomale 60S-Untereinheit dazukommt und die erste Peptidbindung geknüpft wird [*Scanning*-Modell der Initiation, Überblick in 88]. Auf dem Weg der 40S-Untereinheit ist der Komplex in der Lage, gewisse Sekundärstrukturen zu überwinden. Eine mäßig stabile Haarnadelstruktur von -30 kcal/mol behindert die Initiation daher nicht. Bei größeren Energiebeträgen der Sekundärstruktur wird die Translation behindert [86]. Die berechneten Energien in den 5'-Bereichen der Domänenkonstrukte überschritten diese kritischen Energiebeträge nicht (Berechnung mit "gcg", Genetic Computers Group, Wisconsin Package), so daß bezüglich dieses Punktes keine negativen Auswirkungen auf die Translation zu erwarten gewesen waren. Da bei beiden Konstrukten die theoretischen Voraussetzungen für eine erfolgreiche Translation gegeben waren, die Translation in den verschiedenen Klonen jedoch nicht stattfand, ist davon auszugehen, daß in der Zelle ein Kompensationsmechanismus eingeschaltet wurde, der der Expression der Fremd-DNA entgegenwirkte.

Obwohl die Translationsprodukte der Domänen-DNA nicht nachgewiesen werden konnten, wurde die durch IL-1 induzierbare ICAM-Expression in den Klonen gemessen, die die Fremd-DNA in hohem Maß transkribierten. Die ICAM-Expression der Klone mit integrierter Substraterkennungsdomänen-DNA zeigte keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollzelllinie ECV/V2; bei einigen der ATPase-Domänen-Klone waren jedoch abweichende Reaktionen festzustellen. Zwei der fünf Klone, die die DNA der ATPase-Domäne stark transkribierten, wiesen eine um 50% bzw. 75% verminderte ICAM-Induzierbarkeit im Vergleich mit der Kontrollzelllinie auf. Zwei weitere Klone, die nur einen relativ niedrigen Level der ATPase-Domänen-RNA aufwiesen, zeigten keine signifikante Veränderung in der ICAM-Expression. Ein Klon, der die Fremd-DNA etwa fünfmal so stark wie die endogene mRNA für Mortalin exprimierte, zeigte ebenfalls keine signifikante Veränderung der ICAM-Induzierbarkeit. Die Unterschiede in der ICAM-Expression lassen sich also nicht mit dem Level der Transkription der Domänen-DNA korrelieren, und da es auch, wie oben beschrieben, nicht zur Translation der Domänen-RNA kam, muß davon ausgegangen werden, daß es sich bei den Unterschieden in der Induzierbarkeit von ICAM-1 um klonale Effekte handelte.

Nur 17% der Klone (fünf von 30), die nach der Transfektion mit dem Konstrukt für die ATPase-Domäne isoliert worden waren, transkribierten die DNA der Domäne, wohingegen alle 30 Klone die Neomycinresistenz, die ebenfalls auf dem Plasmid codiert war, stabil exprimierten. Diese geringe Effizienz der Transfektion und die Tatsache, daß die wenigen Klone, die die Domänen-RNA aufwiesen, sie nicht in Protein umsetzten, läßt vermuten, daß eine überexprimierte ATPase- oder Substraterkennungsdomäne für die Zelle schädliche Effekte mit sich bringt. Die

Zelle wäre dann gezwungen, gegenregulatorische Mechanismen einzuschalten, die die Expression der Domäne verhindern. Wie schon in der Diskussion der Ergebnisse des *Sense/Antisense*-Ansatzes erwähnt, könnte es sich bei Mortalin um ein Protein handeln, das für grundsätzliche Funktionen in der Zelle notwendig ist, so daß es von daher mit dem *Dominant/Negative*-Ansatz nicht möglich war, in die Funktion von Mortalin in der Zelle einzugreifen.

Um kompensatorische Regulationsmechanismen der Zelle möglichst zu umgehen, könnte es im Fall der Überexpression der Domänen von Mortalin und evtl. auch für den *Sense/Antisense*-Ansatz sinnvoll sein, ein induzierbares Expressionssystem einzusetzen. In eukaryontischen Zellen ist die Verwendung von entsprechenden Systemen aber nicht unproblematisch und sehr zeitaufwendig, daher wurde im Rahmen dieser Arbeit davon abgesehen.

4.6 Die Lokalisation von Mortalin

In der Literatur werden widersprüchliche Angaben zur intrazellulären Lokalisation von Mortalin/CSA/PBP74 gemacht. VanBursik et al. lokalisierten das Protein mit einem für PBP72/74 spezifischen Kaninchenserum auf der Zelloberfläche von B-Zellen und Makrophagen, nicht jedoch auf T-Zellen, NK-Zellen oder Fibroblasten. Durch Immunoelektronen-Mikroskopie konnten die Autoren 36% des Proteins in frühen, endocytotischen Vesikeln beobachten; weiterhin war das Protein auch an der Plasmamembran, am Endoplasmatischen Retikulum und am Golgi-Apparat vorhanden [163]. Domanico et al. setzten einen Peptidantikörper gegen die 16 aminoterminalen Aminosäuren des reifen Proteins ein und konnten PBP74 in der Konfokalmikroskopie hauptsächlich in cytoplasmatischen Vesikeln lokalisieren [42]. Wadhwa et al. [167] beschreiben eine cytosolische und eine perinukleäre Form von Mortalin, und Michikawa et al. zeigten durch immunohistochemische Analyse mit einem monoklonalen Antikörper gegen CSA eine mitochondriale Lokalisation des Proteins. Die Autoren stellten keine signifikante Färbung von Kern, Plasmamembran, Endoplasmatischem Retikulum oder Golgi-Apparat fest [113]. Bhattacharyya et al. führten eine Cofraktionierung der humanen Form von Mortalin/CSA/PBP74 zusammen mit mitochondrialen Markerenzymen durch. Weiterhin konnten die Autoren durch Transfektion des Proteins, das am Carboxyterminus mit einem Epitop-Tag versehenen worden war, in einem anschließenden Immunofluoreszenznachweis eine Lokalisation in den Mitochondrien belegen [10].

Durch den hochspezifischen Antikörper Anti-Mot war ein gutes Werkzeug vorhanden, die intrazelluläre Verteilung von Mortalin im Rahmen dieser Arbeit zu klären. Die Immunofluoreszenzfärbung von der T-Zelllinie EL4-6.1 zeigte eine mitochondriale Verteilung von Mortalin. Eine parallele Anfärbung mit einem für die Mitochondrien spezifischen Farbstoff ergab ein übereinstimmendes Bild. Die Aufnahmen aus der Transmissionselektronen-Mikroskopie der mit Anti-Mot markierten Zellen bestätigten die vorwiegend mitochondriale Lokalisation von Mortalin. Es konnten jedoch auch einige weitere Markierungen im Cytosol und im Kern beobachtet werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß es sich hierbei um eine Hintergrundfärbung oder um Artefakte handelte, die durch Fixierung und Schneiden der Zellen

bedingt waren. Diese intrazelluläre Verteilung von Mortalin war bei unstimulierten Zellen als auch bei Zellen, die 10 min oder 30 min mit IL-1 β stimuliert worden waren, identisch. Dieses Ergebnis zur intrazellulären Verteilung von Mortalin stimmt mit den von Michikawa et al. [113] und Bhattacharyya et al. [10] veröffentlichten Beobachtungen überein. Die abweichenden Ergebnisse von VanBursik et al. [163], Domanico et al. [42] und Wadhwa et al. [167], die von einer Lokalisation auf Zelloberflächen, in cytoplasmatischen Vesikeln bzw. im Cytosol und im perinukleären Bereich sprechen, lassen sich evtl. auf die Verwendung von nicht genügend spezifischen Antikörpern bei der immunohistochemischen Analyse zurückführen. Beispielsweise setzten Domanico et al. [42] einen Peptidantikörper gegen die 16 aminoterminalen Aminosäuren des reifen Proteins ein. Von diesen 16 Aminosäuren sind neun mit der Sequenz von BiP und acht mit den Sequenzen von Hsc70 und dem durch Hitzeschock induzierbaren Hsp70 identisch. Es ist daher anzunehmen, daß dieser Peptidantikörper eine gewisse Kreuzreaktion mit den anderen Mitgliedern der Hsp70-Familie zeigt. Eine Kreuzreaktion des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörpers Anti-Mot mit anderen Mitgliedern der Hsp70-Familie ist auszuschließen, da in Western-Blots mit Zellextrakten verschiedener Zellen jeweils nur eine Bande mit dem Anti-Mot-Serum reagierte, wo mit anderen Hsp70-spezifischen Antikörpern bis zu vier Banden zu detektieren waren. Aus diesem Grund ist es auch unwahrscheinlich, daß es sich bei der Reaktion von Anti-Mot mit einem Protein in den Mitochondrien um eine unspezifische Affinität handelte, denn in diesem Fall wären in Western-Blots mit dem Anti-Mot-Serum neben der Bande von Mortalin weitere Banden zu beobachten gewesen.

Mortalin ist mit 62% Identität dem Hitzeschock-Protein SSC1 aus *Sacharromyces cerevisiae* sehr ähnlich. Für dieses Protein wurde, wie für Mortalin, eine Lokalisation in den Mitochondrien nachgewiesen [31]. Durch Analyse von temperatursensitiven Mutanten wurde von Kang et al. gezeigt, daß SSC1 an der Translokation von kerncodierten Precursor-Proteinen durch die mitochondrialen Membranen und an der Faltung der importierten Proteine beteiligt ist. Durch Isolierung von Komplexen zwischen Hitzeschock-Protein und Precursor-Protein wurde eine direkte Interaktion nachgewiesen [80]. Schneider et al. legten dar, daß SSC1 einen reversiblen Komplex mit MIM44, einer Komponente des Translokationssystems der inneren Mitochondrienmembran, bildet [150]. Voos et al. konnten durch die Analyse von zwei verschiedenen SSC1-Mutanten die Translokaseaktivität von der Entfaltungsaktivität trennen. Die Translokasefunktion ist unabhängig von der Bildung eines SSC1/TIM44-Komplexes (TIM44 entspricht MIM44, *translocase of the inner mitochondrial membrane*). Die Entfaltungsaktivität, die für die Translokation von Precursor-Proteinen notwendig ist, bedarf der reversiblen, nukleotidabhängigen Interaktion von SSC1 und TIM44 [165]. Die Transportmaschinerie der inneren Mitochondrienmembran besteht aus mindestens drei essentiellen TIM-Proteinen (TIM17, TIM23 und TIM44). TIM17 und TIM23 sind integrale Membranproteine, und es wird vermutet, daß diese Proteine den Translokationskanal für den Durchtritt der Precursor-Proteine bilden. Der Transport beruht auf wechselnden, dynamisch interagierenden Subkomplexen, die transient und in ATP-Abhängigkeit mit SSC1 assoziieren [13]. Durch die Analyse von nativen Proteinkomplexen wurde von Dekker et al. gezeigt, daß das Kernstück der Transportmaschinerie der inneren Mitochondrienmembran ein 90 kD-Komplex ist, der TIM23 und TIM17 enthält. Durch ein Precursor-Protein wird der Komplex des Transportsystems der äußeren Mitochondrienmembran mit diesem 90 kD-Komplex zu einem 600 kD-Superkomplex verbunden. SSC1 und TIM44 sind für die Stabilität dieses

Superkomplexes nicht notwendig, daher besteht die Aufgabe des mitochondrialen Hitzeschock-Proteins möglicherweise nicht in der direkten Interaktion mit dem Precursor-Protein, sondern in einer regulatorischen Kontrolle des Transportkomplexes [35].

Aufgrund der großen Ähnlichkeit zwischen dem Hitzeschock-Protein SSC1 aus *S. cerevisiae* und Mortalin sowie der vergleichbaren Lokalisation, ist zu vermuten, daß auch Mortalin bei dem ATP-getriebenen Import von Precursor-Proteinen in die Mitochondrien eine Rolle spielt.

Die Funktion von Mortalin in den Mitochondrien scheint nicht mit dem IL-1-Signaltransfer in Zusammenhang zu stehen, wie erklärt sich also die Assoziation von Mortalin mit dem IL-1-Rezeptor auf der einen Seite und die durch die immunohistochemische Analyse belegte mitochondriale Lokalisation von Mortalin auf der anderen Seite?

Es stellt sich zunächst die Frage, ob es sich bei der im Immunopräzipitat des IL-1-Rezeptors festgestellten Assoziation von Mortalin um ein Artefakt handeln könnte. Gegen ein Artefakt spricht die Tatsache, daß die Coimmunopräzipitation von Rezeptor und Mortalin in fünf unterschiedlichen Zelllinien gefunden wurde, wobei zwei unterschiedliche Antikörper gegen den IL-1-Rezeptor verwendet wurden. Weiterhin bleibt die Assoziation auch nach ausgiebigem Waschen bestehen und läßt sich spezifisch mit mmolaren Konzentrationen von ATP auflösen. Ein weiterer Punkt ist die fast ausschließliche Anreicherung von Mortalin (bezogen auf die Hsp70-Familie) im IL-1RI-Immunopräzipitat. So sind z. B. in der Zelllinie ECV-304 auch andere Hsp70-Mitglieder in vergleichbarer Intensität im Zellextrakt vorhanden, die nur in zu vernachlässigendem Umfang copräzipitiert werden, obwohl alle Hsp70 eine gewisse Affinität zu Peptiden aufweisen [59]. Diese Tatsachen sprechen dafür, daß es sich bei der Assoziation von Mortalin am IL-1-Rezeptorkomplex nicht um ein Artefakt handelt. Wenn dies so ist, muß Mortalin neben seiner hypothetischen Beteiligung am Proteinimport in die Mitochondrien eine weitere Aufgabe in der Zelle besitzen.

Mortalin wurde in Assoziation mit dem IL-1-Rezeptorkomplex gefunden, und die von Mizel et al. [117] und Curtis et al. [34] belegte Internalisierung des gesamten IL-1-Rezeptorkomplexes macht Hilfsfaktoren notwendig, die den Transport des Komplexes von der Zellmembran bis zum Kern bewerkstelligen. Die Beteiligung eines Proteins mit Chaperonfunktion, wie z. B. das Mitglied der Hsp70-Familie Mortalin, liegt daher nahe. Warum zeigte sich jedoch in der immunohistochemischen Analyse keine eindeutige Lokalisation von Mortalin an der Zellmembran, im Cytosol sowie im Kernbereich, wenn das Protein *in vivo* mit dem IL-1-Rezeptor assoziiert ist, welcher an der Membran lokalisiert ist und nach Aktivierung internalisiert wird? Zum einen ist wahrscheinlich nur ein kleiner Teil des gesamten in der Zelle vorhandenen Mortalins mit dem Rezeptor assoziiert, denn der Rezeptor ist, wie allgemein die am Signaltransfer beteiligten Proteine, in nur sehr geringer Konzentration in der Zelle vorhanden. Zum anderen könnte das Epitop des Antikörpers Anti-Mot, d. h. das carboxyterminale Ende des Proteins, durch die Assoziation von Mortalin mit seinem Substrat blockiert und damit nicht mehr für den Antikörper zugänglich sein. In diesem Fall wäre das mit dem IL-1-Rezeptor assoziierte Protein in der Immunohistochemie nicht zu detektieren.

4.7 Schlußbetrachtung und Ausblick

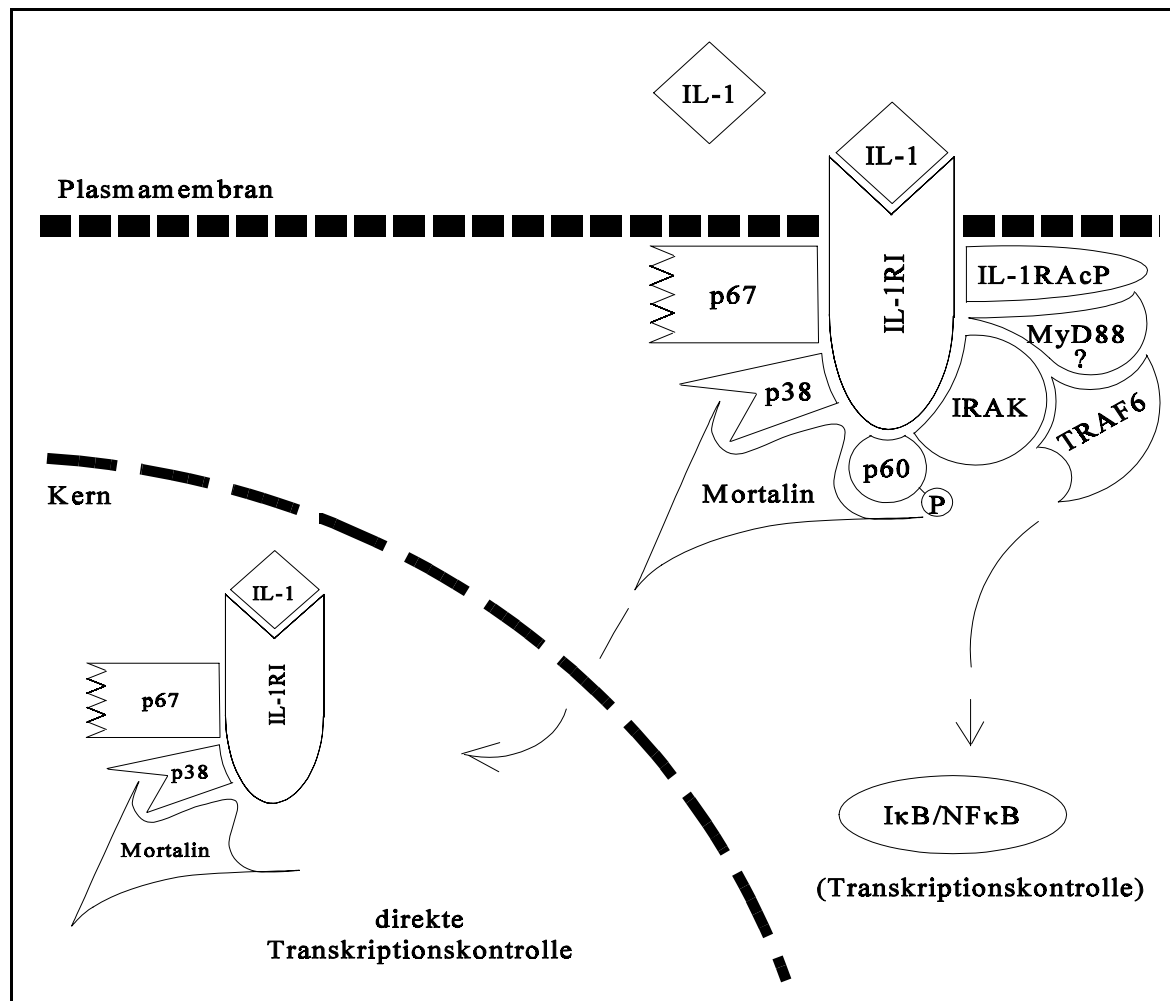


Abbildung 57: Neues Modell des Geschehens am IL-1-Rezeptor. Neben der durch den stimulierten IL-1-Rezeptor verursachten NFκB-Aktivierung unter Beteiligung von IRAK und TRAF6 wird der Rezeptorkomplex mit Unterstützung von Mortalin in den Kern transportiert und wirkt hier direkt mit Hilfe der nukleinsäurebindenden Proteine p38 und p67 auf die Transkriptionskontrolle.

Die Existenz von zwei nukleinsäurebindenden Proteinen im Rezeptorkomplex, die im Immunopräzipitat des IL-1-Rezeptors im Rahmen dieser Arbeit identifiziert wurden, sowie die bekannte Internalisierung des Rezeptorkomplexes legen die Vermutung nahe, daß der Komplex direkt an der Transkriptionskontrolle durch eine Interaktion mit der DNA beteiligt ist (siehe Abb. 57). Diese Funktion stellt den IL-1-Rezeptor in die Nähe der Steroidrezeptoren, die nach Komplexbildung mit dem jeweiligen intrazellulären Liganden unmittelbar durch Bindung an regulatorische Elemente des entsprechenden Gens auf die Genexpression wirken [z. B. 61]. Viele Rezeptoren leiten nach Ligandenbindung das Signal durch die Aktivierung einer Kinasekaskade in die Zelle weiter [zusammengefaßt in 73]. So wie bei diesen Rezeptoren führt auch bei dem IL-1-Rezeptor die Ligandenbindung zur Aktivierung einer assoziierten Kinase. Der Interleukin-1-Rezeptor läßt sich demnach in keines der beiden Schemata einfügen. Auf der einen Seite wird eine Kinase (IRAK), wie bei anderen Zytokinrezeptoren, aktiviert; auf der anderen Seite wird der Rezeptor als intakter Komplex internalisiert und mutet eher wie ein Steroidrezeptor an. Der IL-1-Rezeptor nimmt daher eine Zwischenstellung zwischen den bekannten, verallgemeinerten Rezeptortypen ein. Man könnte evtl. von einer Bifunktionalität im Sinne einer Teilung der Signalwege sprechen. (i) Zum einen wird das Signal über eine Kinasekaskade in die Zelle hinein geleitet. Ein sehr frühes Ereignis dieser Kaskade ist die Aktivierung der rezeptorassoziierten Kinase IRAK. (ii) Zum anderen läuft ein weiterer Signalweg über die Internalisierung des Rezeptors und die unmittelbare Transkriptionskontrolle durch den Rezeptorkomplex. Hieran sind wahrscheinlich direkt die in dieser Arbeit isolierten nukleinsäurebindenden Proteine p38 und p67 des Rezeptorkomplexes beteiligt. Die Funktion von Mortalin bei diesem Vorgang konnte mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig geklärt werden; doch die spezifische Assoziation von Mortalin am IL-1-Rezeptorkomplex deutet auf eine Beteiligung dieses Proteins an einem ATP-abhängigen Transport des aktivierten Rezeptorkomplexes von der Zellmembran bis zum Kern hin (Abb. 57).

In den letzten drei Jahren hat eine rasante Entwicklung in der Forschung auf dem Gebiet des IL-1-Rezeptorkomplexes stattgefunden. Verschiedene Faktoren, die am IL-1-Signaltransfer beteiligt sind, wurden identifiziert und molekular charakterisiert [67, 114, 133, 19, 20]. Der direkten Interaktion des aktivierten Rezeptorkomplexes mit der DNA ist bisher jedoch nur wenig Beachtung geschenkt worden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit machen die Bedeutung dieses Prozesses deutlich. Weitere Untersuchungen zur Interaktion des aktivierten Rezeptorkomplexes mit der DNA, zum Bindungsverhalten und zur Spezifität dieser Interaktion wären daher sehr interessant. Die Analyse von Zelllinien, die nicht in der Lage sind, den IL-1-Rezeptor zu internalisieren, könnte Antworten auf die Frage geben, in welcher Form Mortalin und die rezeptorassoziierten Proteine p38 und p67 an diesen Vorgängen beteiligt sind. Hierfür wäre selbstverständlich auch die Klonierung und Sequenzierung sowie die Untersuchung des DNA-Bindungsverhaltens der Proteine p38 und p67 notwendig.

Durch die kürzlich beschriebene Methode der *native blue electrophoresis* [35] ist es möglich, die Größe eines Proteinkomplexes genau zu analysieren. Mit dieser Methode könnte geklärt werden, wie groß der IL-1-Signalkomplex wirklich ist und wie sich die ATP-abhängige Dissoziation von Mortalin auf die Komplexbildung auswirkt.

Die Auftrennung der Proteine des IL-1RI-Immunopräzipitates in einer 2D-Elektrophorese sollte es ermöglichen, weitere Komponenten des Rezeptorkomplexes zu isolieren und aminoterminal

anzusequenzieren. Auf diese Weise könnte es gelingen, die molekulare Natur des endogenen Substrates (p60) der rezeptorassoziierten Kinase zu identifizieren. Ein anderer Ansatz zur Identifizierung weiterer Komponenten des IL-1-Signaltransfers ist die Datenbanksuche nach Proteinen in Säugerzellen, die Homologien zu Proteinen des Toll/Dorsal-Systems aus *Drosophila melanogaster* aufweisen.

Ein vom IL-1-Signaltransfer unabhängiger Aspekt ist die Funktion von Mortalin in den Mitochondrien. Sind Parallelen zur Funktion des mitochondrialen Hitzeschock-Proteins SSC1 aus der Hefe, welches am Transport von kerncodierten Precursor-Proteinen über die mitochondrialen Membranen beteiligt ist, vorhanden? Gibt es in Säugerzellen homologe Proteine zu den TIM-Proteinen aus der Hefe? Hier könnte der Einsatz von Antikörpern gegen entsprechende Hefe-Proteine bei einer evtl. gegebenen Kreuzreaktion hilfreich sein.

Die Expression von Mortalin in einem bakteriellen System (die bereits bearbeitet wird) wird das Material liefern, um eingehende kinetische Studien zur ATP-Bindung und zur ATPase-Funktion von Mortalin durchführen zu können. Das gezielte Einbringen von Mutationen wird weitere Informationen zur Funktion von Mortalin *in vitro* und evtl. *in vivo* liefern.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war zum einen die Charakterisierung einer am IL-1-Rezeptor assoziierten Kinase und zum anderen die Identifizierung weiterer, am IL-1-Signaltransfer beteiligter Faktoren.

Zu diesem Zweck wurde der IL-1-Rezeptorkomplex aus der murinen Thymoma-Zelllinie EL4-6.1 durch eine Immunopräzipitation mit einem gegen den IL-1-Rezeptor (IL-1RI) gerichteten Antikörper isoliert. Mit dieser Präparation wurden Untersuchungen zum Verhalten der rezeptorassoziierten Kinase durchgeführt, die durch eine Stimulierung der intakten Zellen mit IL-1 zu aktivieren ist [Martin et al., Eur J Immunol 24 (1994) 1566-1571]. Für die Messungen im Immunopräzipitat wurde ein Enzymtest etabliert, der die Abtrennung von nicht-hydrolysierten ^{33}P - γ -ATP durch die Verwendung von Phosphocellulose-Membranen ermöglicht. Die Phosphorylierungsaktivitäten des Enzyms waren relativ gering, wie es für eine am Signaltransfer beteiligte Kinase zu erwarten war. Das Enzym war ausschließlich im intakten IL-1-Rezeptorkomplex, d. h. als komplettes Immunopräzipitat aktiv. Die Gegenwart von Detergenzien oder von einer erhöhten Salzkonzentration führte zu einem auffälligen Aktivitätsverlust, so daß davon auszugehen ist, daß das Enzym nur in Assoziation mit dem Rezeptorkomplex seine Aktivität entfaltet. Bezüglich des Verhaltens gegenüber der Temperatur zeigte die Kinase ein relativ breites Temperaturoptimum zwischen 20 und 30°C. Bis zu 37°C war während einer einstündigen Lagerung ein fast vollständiger Erhalt der enzymatischen Aktivität festzustellen; oberhalb dieser Temperatur war ein deutlicher Aktivitätsabfall festzustellen, sowohl in der Temperaturstabilität als auch bei einer derartigen Reaktionstemperatur. Diese Empfindlichkeit gegenüber leicht erhöhten Temperaturen läßt sich darauf zurückführen, daß die Kinase nur in Verbindung mit dem Rezeptorkomplex aktiv ist; diese Komplexformation wird vermutlich bei höheren Temperaturen instabilisiert.

Die Inkubation des IL-1-Rezeptorkomplexes mit dem ATP-Analog Fluorosulfonylbenzoyladenosen (FSBA) führte zu einer Hemmung der rezeptorassoziierten Kinase bis zu einer Restaktivität von 20%. Durch den Einsatz von radioaktiv markiertem FSBA konnten im IL-1-Rezeptorkomplex drei nukleotidbindende Proteine markiert werden. Die molekulare Natur dieser Proteine konnte allerdings nicht eindeutig geklärt werden. In allen Fällen fand die Markierung unabhängig vom Stimulierungsstatus der Zellen statt. Bei einem dieser Proteine (80 kD) handelt es sich möglicherweise um die rezeptorassoziierte Kinase; ein weiteres markiertes Protein von 25 kD könnte ein GTP-bindendes Protein darstellen.

Neben diesen, durch FSBA zu markierenden Proteinen waren einige weitere Proteine im IL-1RI-Immunopräzipitat nachzuweisen. Es waren diesbezüglich keine Unterschiede zwischen Präparationen aus stimulierten und unstimulierten Zellen festzustellen. Durch eine Modifikation der Immunopräzipitation konnte der Gehalt an Antikörpern im Immunopräzipitat vermindert werden, so daß es möglich wurde, mehrere der rezeptorassoziierten Proteine aminoterminal anzusequenzieren. Bei drei Proteinen waren die Sequenzinformationen ausreichend, um eine sinnvolle Datenbanksuche nach ähnlichen Proteinen durchführen zu können:

- (i) Das aminoterminal Peptid eines der Proteine (p38) weist eine 76%ige Übereinstimmung mit dem aminoterminalen Bereich von hnRNPA2/B1 (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*) auf [Burd et al., Proc Natl Acad Sci USA 86 (1989) 9788-9792]. Dieses Protein, welches auch von seiner Größe her mit p38 aus dem IL-1RI-Immunopräzipitat übereinstimmt, zeichnet sich durch sein Vermögen aus, RNA oder einzelsträngige DNA zu binden und wird in den Zusammenhang mit DNA-Replikation, Rekombination und Transkription gestellt [Dreyfuss et al., Annu Rev Biochem 62 (1993) 289-321].
- (ii) Die aminoterminal Sequenz eines zweiten ansequenzierten Proteins (p67) aus dem Immunopräzipitat stimmt zu 96% mit einem Teil von TLS/FUS überein. Das Genprodukt TLS/FUS wurde in einem Spleißosomenkomplex gefunden und damit als ein nukleinsäurebindendes Protein identifiziert [Calvio et al., RNA 1 (1995) 724-733]. Das aminoterminal Peptid von p67 aus dem IL-1RI-Immunopräzipitat entspricht allerdings nicht dem Aminoterminus von TLS/FUS, sondern korrespondiert mit dem letzten Drittel von TLS/FUS. Es muß sich also um eine Variante dieses Genproduktes im IL-1RI-Immunopräzipitat handeln. TLS/FUS bildet im carboxyterminalen Bereich eine Zinkfingerstruktur aus; diese Struktur ist vermutlich auch in dem Protein des Rezeptorkomplexes vorhanden, so daß es sich bei p67 wahrscheinlich um ein DNA-bindendes Protein handelt.
- (iii) Bei einem dritten Protein (p74) des IL-1-Rezeptorkomplexes wurden neben den aminoterminalen 30 Aminosäuren noch zwei weitere interne Peptide sequenziert. Sämtliche Peptidsequenzinformationen stimmen mit den sehr ähnlichen Proteinen Mortalin, PBP74 und CSA überein, welche von verschiedenen Arbeitsgruppen in unterschiedlichen Zusammenhängen beschrieben worden sind [Wadhwa et al., JBC 268 (1993) 6615-6621; Wadhwa et al., JBC 268 (1993) 22239-22242; Domanico et al., Mol Cell Biol 13 (1993) 3598-3610; Michikawa et al., Biochem Biophys Res Com 196 (1993) 223-232]. Die TA-Klonierung und Sequenzierung des Proteins p74 zeigte auf Nukleotidebene einige Differenzen mit den veröffentlichten Sequenzen. Die größte Übereinstimmung war zwischen Mortalin (mot-2) und p74 vorhanden; auf Aminosäureebene zeigte p74 lediglich eine konservative Aminosäuresubstitution im Vergleich mit Mortalin (mot-2). p74 wurde daher als Mortalin (mot-3) bezeichnet.

Aufgrund von Sequenzhomologien ist Mortalin in die Familie der Hsp70 einzuordnen. Ein allgemeines Merkmal dieser Familie ist die ATP-abhängige Interaktion mit anderen Proteinen, welche sich in einer konservierten, strukturellen Unterteilung der Proteine in eine aminoterminal ATPase-Domäne und in eine carboxyterminal Substraterkennungsdomäne widerspiegelt. In der vorliegenden Arbeit wurde die ATP-abhängige Interaktion von Mortalin mit anderen Proteinen durch die *in vitro*-Dissoziation von Mortalin aus dem IL-1-Rezeptorkomplex gezeigt: Nach einer Inkubation des IL-1RI-Immunopräzipitates mit einer 1 mmolaren ATP-Lösung dissoziierte nahezu 90% dieses Proteins aus dem Rezeptorkomplex. Die Reaktion war von der ATP-Konzentration abhängig und erwies sich als hochspezifisch für ATP. GTP hatte einen wesentlich schwächeren Effekt; andere Nukleotide wie UTP oder CTP, die Deoxynukleotide dATP, dTTT, dGTP und dCTP sowie weitere Nukleotidformen (ADP, γ S-

ATP und cAMP) hatten keine Wirkung auf die *in vitro*-Dissoziation von Mortalin. Die Aktivität der rezeptorassoziierten Kinase wurde nicht durch die *in vitro*-Dissoziation von Mortalin aus dem Rezeptorkomplex beeinflusst.

Durch den hohen Grad der Ähnlichkeit zwischen den Mitgliedern der Hsp70-Familie waren die zur Verfügung stehenden Antikörper nicht spezifisch für Mortalin. Aus diesem Grund wurde ein polyklonaler Antikörper gegen die 14 Aminosäuren des Carboxyterminus von Mortalin hergestellt. Dieses Antikörperserum erwies sich als hochspezifisch für Mortalin und wurde genutzt, um die intrazelluläre Lokalisation von Mortalin zu klären. Durch Immunofluoreszenz und elektronenmikroskopische Aufnahmen konnte gezeigt werden, daß Mortalin vorwiegend in den Mitochondrien nachweisbar ist.

Um die Funktion von Mortalin *in vivo* zu untersuchen, wurde ein *Sense/Antisense*- und ein *Dominant/Negative*-Ansatz angewendet. Entsprechende Konstrukte wurden in die humane Endothelzelllinie ECV-304 integriert und die resultierenden Klone bezüglich der Expression von Mortalin und ihres Verhaltens gegenüber IL-1 analysiert. Durch die molekularbiologischen Ansätze konnte die Expression von Mortalin jedoch nicht beeinflusst werden, so daß anzunehmen ist, daß Mortalin in der Zelle eine essentielle Funktion ausübt.

Die Aufgabe von Mortalin im IL-1-Signaltransfer konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, doch es ist zu vermuten, daß Mortalin an der Internalisierung des aktivierten Rezeptorkomplexes beteiligt ist. Die Existenz von zwei am IL-1-Rezeptor assoziierten nukleinsäurebindenden Proteinen (p38 und p67) gibt einen deutlichen Hinweis darauf, daß die unmittelbare Beteiligung des internalisierten Rezeptorkomplexes an der durch IL-1-vermittelten Genexpression von wichtiger Bedeutung ist.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Alliegro, M. C.; Alliegro, M. A.: A nuclear protein regulated during the transition from active to quiescent phenotype in cultured endothelial cells. *Development Biology* 174 (1996) 288-297
- [2] Andreas, C.; Wagner, C.; Williams, J. A.: Low molecular weight GTP-binding proteins: Molecular switches regulating diverse cellular functions. *Am. J. Phys.* 266 (1994) G1-14
- [3] Annamalai, A. E.; Colman, R. F.: Reaction of the adenine nucleotide analogue 5'-p-fluorosulfonylbenzoyl adenosine at distinct tyrosine and cysteine residues of rabbit muscle pyruvate kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 256 (1981) 10276-10283
- [4] Arend, W. P.; Joslin, F. G.; Massoni, R. J.: Effects of immune complexes on production by human monocytes of interleukin 1 or an interleukin 1 inhibitor. *The Journal of Immunology* 134 (1985) 3868-3875
- [5] Arend, W. P.: Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv. Immunol.* 54 (1993) 167-227
- [6] Arrigo, A.-P.: Small stress proteins: Chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death. *Biol. Chem.* 379 (1998) 19-26
- [7] Auron, P. E.; Webb, A. C.; Rosenwasser, L. J.; Mucci, S. F.; Rich, A.; Wolff, S. M.; Dinarello, C. A.: Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 7907-7911
- [8] Balavoine, J.-F.; de Rochemonteix, B.; Seckinger, P.; Cruchaud, A.; Dayer, J.-M.: Prostaglandin E2 and collagenase production by fibroblasts and synovial cells is regulated by urine-derived human interleukin 1 and inhibitor(s). *J. Clin. Invest.* 78 (1986) 1120-1124
- [9] Berczi, I.: Neuroendocrine defence in endotoxin shock. *Acta Microbiol. Hung.* 40 (1993) 265-302
- [10] Bhattacharyya, T.; Karneszi, A. N.; Murphy, S. P.; Hoang, T.; Freeman, B. C.; Phillips, B.; Morimoto, R. I.: Cloning and subcellular localization of human mitochondrial hsp70. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (1995) 1705-1710
- [11] Bird, T. A.; Sleath, P. R.; deRoos, P. C.; Dower, S. K.; Virca, G. D.: Interleukin-1 represents a new modality for the activation of extracellular signal-regulated kinases/microtubule-associated protein-2 kinases. *The Journal of Biological Chemistry* 266 (1991) 22661-22670

-
- [12] Blasey, H. D.; Jäger, V.: Strategies to increase the efficiency of membrane aerated and perfused animal cell bioreactors by an improved medium perfusion. *Animal Cell Culture and Production of Biologicals* (1991) 61-73
- [13] Bömer U.; Meijer, M.; Maarse, A. C.; Hönliger, A.; Dekker, P. J. T.; Pfanner, N.; Rassow, J.: Multiple interactions of components mediating preprotein translocation across the inner mitochondrial membrane. *The EMBO Journal* 16 (1997) 2205-2216
- [14] Boeve, C. M. A.; vanden Wyngaerd, A.; de Ley, M.: Inhibition of human Interferon- γ biosynthesis by an antisense RNA-expressing vector. *Molecular Pharmacology* 49 (1996) 58-62
- [15] Brigelius-Flohé, R.; Friedrichs, B.; Maurer, S.; Schultz, M.; Streicher, R.: Interleukin-1-induced nuclear factor κ B activation is inhibited by overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in a human endothelial cell line. *Biochem. J.* 328 (1997) 199-203
- [16] Brooks, J. W.; Mizel, S. B.: Interleukin-1 signal transduction. *Eur. Cytokine Netw.* 5 (1994) 547-561
- [17] Burd, C. G., Swanson, M. S., Görlach, M., Dreyfuss, G.: Primary structures of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2, B1, and C2 proteins: A diversity of RNA binding proteins is generated by small peptide inserts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 9788-9792
- [18] Calvio, C.; Neubauer, G.; Mann, M.; Lamond, A. I.: Identification of hnRNP P2 as TLS/FUS using electrospray mass spectrometry. *RNA* 1 (1995) 724-733
- [19] Cao, Z.; Henzel, W. J.; Gao, X.: IRAK: A kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science* 271 (1996) 1128-1131
- [20] Cao, Z.; Xiong, J.; Takeuchi, M.; Kurama, T.; Goeddel, D. V.: TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383 (1996) 443-446
- [21] Chappell, T. G.; Welch, W. J.; Schlossman, D. M.; Palter, K. B.; Schlesinger, M. J.; Rothman, J. E.: Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins. *Cell* 45 (1986) 3-13
- [22] Chedid, M.; Mizel, S. B.: Involvement of cyclic AMP-dependent protein kinases in the signal transduction pathway for interleukin-1. *Molecular and Cellular Biology* 10 (1990) 3824-3827
- [23] Chirico, W. J.; Waters, M. G.; Blobel, G.: 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* 322 (1988) 805-810

- [24] Chizzonite, R.; Truitt, T.; Kilian, P. L.; Stern, A. S.; Nunes, P.; Parker, K. P.; Kaffka, K. L.; Chua, A. O.; Lugg, D. K.; Gubler, U.: Two high-affinity interleukin 1 receptors represent separate gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 8029-8033
- [25] Clark, M. A.; Özgür, L. E.; Conway, T. M.; Dispoto, J.; Crooke, S. T.; Bomalaski, J. S.: Cloning of a phospholipase A₂-activating protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 5418-5422
- [26] Clarke, C. F.; Cheng, K.; Frey, A. B.; Stein, R.; Hinds, P. W.; Levine, A. J.: Purification of complexes of nuclear oncogene p53 with rat and *Escherichia coli* heat shock proteins: In vitro dissociation of hsc70 and dnaK from murine p53 by ATP. *Molecular and Cellular Biology* 8 (1988) 1206-1215
- [27] Collins, T.; Read, M. A.; Neish, A. S.; Whitley, M. Z.; Thanos, D.; Maniatis, T.: Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-κB and cytokine-inducible enhancers. *FASEB Journal*. 9 (1995) 899-909
- [28] Colman, R. F.; Pal, P. K.; Wyatt, J. L.: Adenosine derivatives for dehydrogenases and kinases. *Methods Enzymol.* 46 (1977) 240-249
- [29] Colotta, F.; Re, F.; Muzio, M.; Bertini, R.; Polentarutti, N.; Sironi, M.; Giri, J. G.; Dower, S. K.; Sims, J. E.; Mantovani, A.: Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 261 (1993) 472-475
- [30] Craig, E. A.; Kramer, J.; Kosic-Smithers, J.: SSC1, a member of the 70-kDa heat shock protein multigene family of *Saccharomyces cerevisiae*, is essential for growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 4156-4160
- [31] Craig, E. A.; Kramer, J.; Shilling, J.; Werner-Washburne, M.; Holmes, S.; Kosic-Smithers, J.; Nicolet, C. M.: SSC1, an essential member of the yeast HSP70 multigene family, encodes a mitochondrial protein. *Molecular and Cellular Biology* 9 (1989) 3000-3008
- [32] Croston, G. E.; Cao, Z.; Goeddel, D.: NFκB activation by interleukin-1 (IL-1) requires an IL-1 receptor-associated protein kinase activity. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (1995) 16514-16517
- [33] Crozat, A.; Aman, P.; Mandahl, N.; Ron, D.: Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma. *Nature* 363 (1993) 640-644
- [34] Curtis, B. M.; Widmer, M. B.; Deroos, P.; Qwarnstrom, E. E.: IL-1 and its receptor are translocated to the nucleus. *The Journal of Immunology* 144 (1990) 1295-1303

-
- [35] Dekker, P. J. T.; Martin, F.; Maarse, A. C.; Bömer, U.; Müller, H.; Guiard, B.; Meijer, M.; Rassow, J.; Pfanner, N.: The Tim core complex defines the number of mitochondrial translocation contact sites and can hold arrested preproteins in the absence of matrix Hsp70-Tim44. *The EMBO Journal* 16 (1997) 5408-5419
- [36] DeLuca, D.; Mizel, S. B.: I-A-positive nonlymphoid cell and T cell development in murine fetal thymus organ cultures: interleukin 1 circumvents the block in T cell differentiation induced by monoclonal anti-I-A antibodies. *The Journal of Immunology* 137 (1986) 1435-1441
- [37] Deshaies, R. J.; Koch, B. D.; Werner-Washburne, M.; Criag, E. A.; Shekman, R.: A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* 332 (1988) 800-805
- [38] Dinarello, C. A.: Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77 (1991) 1627-1652
- [39] Dinarello, C. A.: Interleukin-1 in disease. *Keio J. Med.* 43 (1994) 131-136
- [40] Dinarello, C. A.: The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J.* 8 (1994) 1314-1325
- [41] Dinarello, C. A.: Biological basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87 (1996) 2095-2147
- [42] Domanico, S. Z.; DeNagel, D. C.; Dahlseid, J. N.; Green, J. M.; Pierce, S. K.: Cloning of the gene encoding peptide-binding protein 74 shows that it is a new member of the heat shock protein 70 family. *Molecular and Cellular Biology* 13 (1993) 3598-3610
- [43] Dower, S. K.; McMahan, C.; Flack, J.; Grubin, C.; Lupton, S.; Moseley, B.; Sims, G. E.: Molecular characterization of two types of interleukin-1 receptor coding peptides on murine and human cells. *J. Leukoc. Biol.* 1 (1990) 103
- [44] Dreyfuss, G.; Matunis, M. J.; Piñol-Roma, S.; Burd, C. G.: HnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem.* 62 (1993) 289-321
- [45] Eastgate, J. A.; Symons, J. A.; Wood, N. C.; Grinlinton, F. M.; di Giovine, F. S.; Duff, G. W.: Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. *Lancet* 2 (1988) 706-709
- [46] Eisenberg, S. P.; Evans, R. J.; Arend, W. P.; Verderber, E.; Brewer, M. T.; Hannum, C. H.; Thompson, R. C.: Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature* 343 (1990) 341-346

- [47] Elliott, M. J.; Maini, R. N.: Anti-cytokine therapy in rheumatoid arthritis. *Baillieres Clin. Rheumatol.* 9 (1995) 633-652
- [48] Erba, H. P.; Gunning, P.; Kedes, L.: Nucleotide sequence of the human gamma cytoskeletal actin mRNA. *Nucleic Acids Res.* 14 (1986) 5275-5294
- [49] Estes, P. A.; Suba, E. J.; Lawler-Heavner, J.; Elashry-Stowers, D.; Wei, L. L.; Toft, D. O.; Sullivan, W. P.; Horwitz, K. B.; Edwards, D. P.: Immunologic analysis of human breast cancer progesterone receptors. 1. Immunoaffinity purification of transformed receptors and production of monoclonal antibodies. *Biochemistry* 26 (1987) 6250-6262
- [50] Estrov, Z.; Kurzrock, R.; Wetzler, M.; Kantarjian, H.; Blake, M.; Harris, D.; Gutterman, J. U.; Talpaz, M.: Suppression of chronic myelogenous leukemia colony growth by IL-1 receptor antagonist and soluble IL-1 receptors: A novel application for inhibitors of IL-1 activity. *Blood* 78 (1991) 1476-1484
- [51] Farrar, W. L.; Mizel, S. B.; Farrar, J. J.: Participation of lymphocyte activation factor (interleukin 1) in the induction of cytotoxic T cell responses. *The Journal of Immunology* 124 (1980) 1371-1377
- [52] Flaherty, K. M.; DeLuca-Flaherty, C.; McKay, D. B.: Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* 346 (1990) 623-628
- [53] Fernandez, J.; Andrews, L.; Mische, S. M.: An improved procedure for enzymatic digestion of polyvinylidene difluoride-bound proteins for internal sequence analysis. *Anal. Biochem.* 218 (1994) 112-117
- [54] Freshney, N. W.; Rawlinson, L.; Guesdon, F.; Jones, E.; Crowley, S.; Hsuan, J.; Saklatvala, J.: Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of hsp27. *Cell* 78 (1994) 1039-1049
- [55] Gallis, B.; Prickett, K. S.; Jackson, J.; Slack, J.; Schooley, K.; Sims, J. E.; Dower, S. K.: IL-1 induces rapid phosphorylation of the IL-1 receptor. *The Journal of Immunology* 143 (1989) 3235-3240
- [56] Gay, N. J.; Keith, F. J.: *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351 (1991) 355-356
- [57] Gayle, M. A.; Slack, J. L.; Bonnert, T. P.; Renshaw, B. R.; Sonoda, G.; Taguchi, T.; Testa, J. R.; Dower, S. K.; Sims, J. E.: Cloning of a putative ligand for the T1/ST2 receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 271 (1996) 5784-5789
- [58] Gery, I.; Gershon, R. K.; Waksman, B. H.: Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. *J. Exp. Med.* 136 (1972) 128

-
- [59] Gething, M.-J.; Sambrook, J.: Protein folding in the cell. *Nature* 355 (1992) 33-45
- [60] Ghosh, M. K.; Cohen, J. S.: Oligodeoxynucleotides as antisense inhibitors of gene expression. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 42 (1992) 79-126
- [61] Giguère, V.; Hollenberg, S. M.; Rosenfeld, M. G.; Evans, R. M.: Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 46 (1986) 645-652
- [62] Gilman, A. G.: G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56 (1987): 615-649
- [63] Giri, J. G.; Kincade, P. W.; Mizel, S. B.: Interleukin-1-mediated induction of κ light chain synthesis and surface immunoglobulin expression on pre-B cells. *The Journal of Immunology* 132 (1984) 223-228
- [64] Glass, D. B.; Masaracchia, R. A.; Feramisco, J. R.; Kemp, B. E.: Isolation of phosphorylated peptides and proteins on ion exchange papers. *Analytical Biochemistry* 87 (1978) 566-575
- [65] Good, P. J.; Rebbert, M. L.; Dawid, I. B.: Three new members of the RNP family in *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Research* 21 (1993) 999-1006
- [66] Gowen, M.; Wood, D. D.; Ihrie, E. J.; MacGuire, M. K. B.; Russel, G.: An interleukin-1 like factor stimulates bone resorption *in vitro*. *Nature* 306 (1983) 378-380
- [67] Greenfeder, S. A.; Nunes, P.; Kwee, L.; Labow, M.; Chizzonite, R. A.: Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (1995) 13757-13765
- [68] Gronich, J.; Konieczkowski, M.; Gelb, M. H.; Nemenoff, R. A.; Sedor, J. R.: Interleukin-1 α causes a rapid activation of cytosolic phospholipase A2 by phosphorylation in rat mesangial cells. *J. Clin. Invest.* 93 (1994) 1224-1233
- [69] Großhans, J.; Bergmann, A.; Haffter, P.; Nüsslein-Volhard, C.: Activation of the kinase Pelle by Tube in the dorsoventral signal transduction pathway of *Drosophila* embryo. *Nature* 372 (1994) 563-566
- [70] Guesdon, F.; Freshney, N.; Waller, R. J.; Rawlinson, L.; Saklatvala, J.: Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate two novel protein kinases that phosphorylate the heat shock protein hsp27 and β -Casein. *The Journal of Biological Chemistry* 268 (1993) 4236-4243
- [71] Guy, G. R.; Cairns, J.; Ng, S. B.; Tan, Y. H.: Inactivation of a redox-sensitive protein phosphatase during the early events of tumor necrosis factor/interleukin-1 signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry* 268 (1993) 2141-2148

- [72] Hackl, W.; Lührmann, R.: Molecular cloning and subcellular localisation of the snRNP-associated protein 69kD, a structural homologue of the proto-oncoproteins TLS and EWS with RNA and DNA-binding properties. *J. Mol. Biol.* 263 (1996) 834-851
- [73] Heldin, C.-H.: Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80 (1995) 213-223
- [74] Hestdal, K.; Ruscetti, F. W.; Chizzonite, R.; Ortiz, M.; Gooya, J. M.; Longo, D. L.; Keller, J. R.: Interleukin-1 (IL-1) directly and indirectly promotes hematopoietic cell growth through type I IL-1 receptor. *Blood* 84 (1994) 125-132
- [75] Hightower, L. E.; Li, T.: Structure and function of the mammalian hsp70 family. In: Heat shock proteins in the nervous system. R. J. Mayer and I. R. Brown, eds Academic Press, London (1994) 1-30
- [76] Horuk, R.; Huang, J. J.; Covington, M.; Newton, R. C.: A biochemical and kinetic analysis of the interleukin-1 receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 262 (1987) 16275-16278
- [77] Howard, M.; Mizel, S. B.; Lachman, L.; Ansel, J.; Johnson, B.; Paul, W. E.: Role of interleukin 1 in anti-immunoglobulin-induced B cell proliferation. *J. Exp. Med.* 157 (1983) 1529-1543
- [78] Hoyos, B.; Ballard, D. W.; Bohnlein, E.; Siekevitz, M.; Greene, W. C.: Kappa B-specific DNA binding proteins: role in the regulation of human interleukin-2 gene expression. *Science* 244 (1989) 457-460
- [79] Itani, T.; Ariga, H.; Yamaguchi, N.; Tadakuma, T.; Yasuda, T.: A simple and efficient liposome method for transfection of DNA into mammalian cells grown in suspension. *Gene* 56 (1987) 267-276
- [80] Kang, P.-J.; Ostermann, J.; Shilling, J.; Neupert, W.; Craig, E. A.; Pfanner, N.: Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature* 348 (1990) 137-143
- [81] Kashles, O.; Yarden, Y.; Fischer, R.; Ullrich, A.; Schlessinger, J.: A dominant negative mutation suppresses the function of normal epidermal growth factor receptors by heterodimerization. *Molecular and Cellular Biology* 11 (1991) 1454-1463
- [82] Kassenbrock, C. K.; Kelly, R. B.: Interaction of heavy chain binding protein (BiP/GRP78) with adenine nucleotides. *The EMBO Journal* 8 (1989) 1461-1467
- [83] Kiertscher, S. M.; Mathews, H. L.: Systemic IL-1 and adjuvant treatment of an experimental tumor. II. Immune status during primary tumor challenge. *Biotherapy* 5 (1992) 259-274

-
- [84] Korherr, C.; Hofmeister, R.; Wesche, H.; Falk, W.: A critical role for interleukin-1 receptor accessory protein in interleukin-1 signaling. *Eur. J. Immunol.* 27 (1997) 262-267
- [85] Kost, S. L.; Smith, D. F.; Sullivan, W. P.; Welch, W. J.; Toft, D. O.: Binding of heat shock proteins of the avian progesterone receptor. *Molecular and Cellular Biology* 9 (1989) 3829-3838
- [86] Kozak, M.: Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 2850-2854
- [87] Kozak, M.: At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* 196 (1987) 947-950
- [88] Kozak, M.: Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *The Journal of Biological Chemistry* 266 (1991) 19867-19870
- [89] Kozu, T.; Henrich, B.; Schäfer, K.: Structure and expression of the gene (HNRPA2B1) encoding the human hnRNP protein A2/B1. *Genomics* 25 (1995) 365-371
- [90] Kumar, A.; Williams, K. R.; Szer, W.: Purification and domain structure of core hnRNP proteins A1 and A2 and their relationship to single-stranded DNA-binding proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 261 (1986) 11266-11273
- [91] Kusakabe, M.; Yokoyama, M.; Sakakura, T.; Nomura, T.; Hosick, H. L.; Nishizuka, Y.: A novel methodology for analysis of cell distribution in chimeric mouse organs using a strain specific antibody. *J. Cell. Biol.* 107 (1988) 257-265
- [92] Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685
- [93] Lakey, E. K.; Margoliash, E.; Pierce, S. K.: Identification of a peptide binding protein that plays a role in antigen presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 1659-1663
- [94] Lammers, R.; Van Obberghen, E.; Ballotti, R.; Schlessinger, J.; Ullrich, A.: Transphosphorylation as a possible mechanism for insulin and epidermal growth factor receptor activation. *The Journal of Biological Chemistry* 265 (1990) 16886-16890
- [95] Lehmann, J.; Vorlop, J.; Büntemeyer, H.: Bubble-free reactors and their development for continuous culture with cell recycle. *Animal Cell Biotechnology* 3 (1988) 222-237
- [96] Leonetti, J. P.; Degols, G.; Clarenc, J. P.; Mechti, N.; Lebleu, B.: Cell delivery and mechanisms of action of antisense oligonucleotides. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 44 (1993) 143-165

- [97] Lewis, C.; Mazzei, G.; Shaw, A.: Monoclonal antibodies reacting with the interleukin 1 receptor define a multi-molecular complex. *Eur. J. Immunol.* 20 (1990) 207-213
- [98] Li, T.; Hightower, L. E.: Effects of dexamethasone, heat shock, and serum responses on the inhibition of Hsc70 synthesis by antisense RNA in NIH 3T3 cells. *Journal of Cellular Physiology* 164 (1995) 344-355
- [99] Liberek, K.; Skowrya, D.; Zylicz, M.; Johnson, C.; Georgopoulos, C.: The *Escherichia coli* DnaK chaperone, the 70-kDa heat shock protein eukaryotic equivalent, changes conformation upon ATP hydrolysis, thus triggering its dissociation from a bound target protein. *The Journal of Biological Chemistry* 266 (1991) 14491-14496
- [100] Likos, J. J.; Hess, B.; Colman, R. F.: Affinity labeling of the active site of yeast pyruvate kinase by 5'fluorosulfonylbenzoyl adenosine. *The Journal of Biological Chemistry* 255 (1980) 9388-9398
- [101] Lomedico, P. T.; Gubler, R.; Hellmann, C. P.; Dukovich, M.; Giri, J. G.; Pan, Y. E.; Collier, K.; Semionow, R.; Chua, A. O.; Mizel, S. B.: Cloning and expression of murine interleukin-1 cDNA in *Escherichia coli*. *Nature* 312 (1984) 458-462
- [102] Lowenthal, J.; MacDonald, H. R.: Binding and internalization of interleukin 1 by T cells. *J. Exp. Med.* 164 (1986) 1060-1074
- [103] Mackenzie, R. C.; Sauder, D. N.; Dinarello, C. A.: Inhibition of B16 melanoma growth in vivo after treatment with interleukin-1 receptor antagonist. (Meeting report) *Clin. Res.* 41 (1993) 465
- [104] Malcolm, A. D. B.: Uses and applications of antisense oligonucleotides. Society/Special Colloquium, 643rd meeting held at the University of Warwick, 22-23 July 1992
- [105] Martin, M.; Böhl, G. F.; Eriksson, A.; Resch, K.; Brigelius-Flohé, R.: Interleukin-1-induced activation of a protein kinase co-precipitating with the type I interleukin-1 receptor in T cells. *Eur. J. Immunol.* 24 (1994) 1566-1571
- [106] Martin, M. U.; Falk, W.: The interleukin-1 receptor complex and interleukin-1 signal transduction. *Eur. Cytokine Netw.* 8 (1997) 5-17
- [107] Massa, S. M.; Longo, F. M.; Zuo, J.; Wang, S.; Chen, J.; Sharp, F. R.: Cloning of rat grp75, an hsp70-family member, and its expression in normal and ischemic brain. *Journal of Neuroscience Research* 40 (1995) 807-819
- [108] Mathias, S.; Younes, A.; Kan, C.-C.; Orlow, I.; Joseph, C.; Kolesnick, R. N.: Activation of the sphingomyelin signaling pathway in intact EL4 cells and in a cell-free system by IL-1 β . *Science* 259 (1993) 519-522

-
- [109] Matrisian, L. M.; Rodland, K. D.; Magun, B. E.: Disruption of intracellular processing of epidermal growth factor by methylamine inhibits epidermal growth factor-induced DNA synthesis but not early morphological or transcriptional events. *The Journal of Biological Chemistry* 262 (1987) 6908-6913
- [110] Matthews, J. S.; O'Neill, L. A.: P38 MAP kinase and the small G protein Rac1 in the induction of IL-2 by IL-1 in T lymphocytes. (Meeting report) *Eur. Cytokine Netw.* 7 (1996) 477
- [111] McMahan, C. J.; Slack, J. L.; Mosley, B.; Cosman, D.; Lupton, S. D.; Brunton, L. L.; Grubin, C. E.; Wignall, J. M.; Jenkins, N. A.; Brannan, C. I.; Copeland, N. G.; Huebner, K.; Croce, C. M.; Cannizzaro, L. A.; Benjamin, D.; Dower, S. K.; Spriggs, M. K.; Sims, J. E.: A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *The EMBO Journal* 10 (1991) 2821-2832
- [112] Mehlen, P.; Kretz-Remy, C.; Preville, X.; Arrigo, A.-P.: Human hsp27, *Drosophila* hsp27 and α B-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNA α -induced cell death. *The EMBO Journal* 15 (1996) 2695-2706
- [113] Michikawa, Y.; Baba, T.; Arai, Y.; Sakakura, T.; Tanaka, M.; Kusakabe, M.: Antigenic protein specific for C3H strain mouse is a mitochondrial stress-70 protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 196 (1993) 223-232
- [114] Mitcham, J. L.; Sims, J. E.: IIP1: A novel human protein that interacts with the IL-1 receptor. *Cytokine* 7 (1995) 596
- [115] Mitcham, J. L.; Parnet, P.; Bonnert, T. P.; Garka, K. E.; Gerhart, M. J.; Slack, J.; Gayle, M. A.; Dower, S. K.; Sims, J. E.: T1/ST2 signaling establishes it as a member of an expanding interleukin-1 receptor family. *The Journal of Biological Chemistry* 271 (1996) 5777-5783
- [116] Mizel, S. B.; Dayer, J. M.; Krane, S. M.; Mergenhagen, S. E.: Stimulation of rheumatoid synovial cell collagenase and prostaglandin production by partially purified lymphocyte-activating factor (interleukin-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 2474-2477
- [117] Mizel, S. B.; Kilian, P. L.; Lewis, J. C.; Paganelli, K. A.; Chizzonite, R. A.: The interleukin 1 receptor. Dynamics of interleukin 1 binding and internalization in T cells and fibroblasts. *The Journal of Immunology* 138 (1987) 2906-2912
- [118] Moynagh, P. N.; Williams, D. C.; O'Neill, L. A. J.: Activation of NF- κ B and induction of vascular cell adhesion molecule-1 and intracellular adhesion molecule-1 expression in human glial cells by IL-1. *The Journal of Immunology* 153 (1994) 2681-2690

- [119] Muegge, K.; Williams, T. M.; Kant, J.; Karin, M.; Chiu, R.; Schmidt, A.; Siebenlist, U.; Young, H. A.; Durum, S. K.: Interleukin-1 costimulatory activity on the interleukin-2 promoter via AP-1. *Science* 246 (1989) 249-251
- [120] Muegge, K.; Vila, M.; Gusella, G. L.; Musso, T.; Herrlich, P.; Stein, B.; Durum, S. K.: Interleukin 1 induction of the *c-jun* promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 7054-7058
- [121] Muñoz, E.; Beutner, U.; Zubiaga, A.; Huber, B. T.: IL-1 activates two separate signal transduction pathways in T helper type II cells. *The Journal of Immunology* 144 (1990) 964-969
- [122] Muñoz, E.; Zubiaga, A.; Huang, C.-K.; Huber, B. T.: Interleukin-1 induces protein tyrosine phosphorylation in T cells. *Eur. J. Immunol.* 22 (1992) 1391-1396
- [123] Muzio, M.; Ni, J.; Feng, P.; Dixit, V. M.: IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 278 (1997) 1612-1615
- [124] Nicholl, D. S. T: *Gentechnische Methoden. Labor im Fokus*, Akademischer Verlag Spektrum (1995)
- [125] Normington, K.; Kohno, K.; Kozutsumi, Y.; Gething, M. J.; Sambrook, J.: *S. cerevisiae* encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP. *Cell* 57 (1989) 1223-1236
- [126] Ohlsson, K.; Björk, P.; Berenfeldt, M.; Hageman, R.; Thompson, R. C.: Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. *Nature* 348 (1990) 550-552
- [127] O'Neill, L. A. J.; Barrett, M. L.; Lewis, G. P.: Induction of cyclo-oxygenase by interleukin-1 in rheumatoid synovial cells. *FEBS* 212 (1987) 35-39
- [128] O'Neill, L. A. J.; Bird, T. A.; Gearing, A. J. H.; Saklatvala, J.: Interleukin-1 signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry* 265 (1989) 3146-3152
- [129] O'Neill, L. A. J.; Bird, T. A.; Saklatvala, J.: Interleukin 1 signal transduction. *Immunology Today* 11 (1990) 392-394
- [130] Osborn, L.; Kunkel, S.; Nabel, G. J.: Tumor necrosis factor α and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 2336-2340
- [131] Palleros, D. R.; Reid, K. L.; Shi, L.; Welch, W. J.; Fink, A. L.: ATP-induced protein-Hsp70 complex dissociation requires K^+ but not ATP hydrolysis. *Nature* 365 (1993) 664-666

-
- [132] Palleros, D. R.; Shi, L.; Reid, K. L.; Fink, A. L.: Hsp70-protein complexes. *The Journal of Biological Chemistry* 269 (1994) 13107-13114
- [133] Parnet, P.; Garka, K. E.; Bonnert, T. P.; Dowers, S. K.; Sims, J. E.: IL-1Rrp is a novel receptor-like molecule similar to the type I interleukin-1 receptor and its homologues T1/ST2 and IL-1RAcP. *The Journal of Biological Chemistry* 271 (1996) 3967-3970
- [134] Pelham, H.: Coming in from the cold. *Nature* 322 (1988) 776-777
- [135] Piñol-Roma, S.; Dreyfuss, G.: Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature* 355 (1992) 730-732
- [136] Potter, H.; Weir, L.; Leder, P.: Enhancer-dependent expression of human κ immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 7161-7165
- [137] Potter M. D.; Powers-Lee, S. G.: Location of the ATP γ -phosphate-binding sites on rat liver carbamoyl-phosphate synthetase I. *The Journal of Biological Chemistry* 267 (1992) 2023-2031
- [138] Pratt, W. B.: Transformation of glucocorticoid and progesterone receptors to the DNA-binding state. *J. Cell. Biochem.* 35 (1987) 51-68
- [139] Rabbitts, T. H.; Forster, A.; Larson, R.; Nathan, P.: Fusion of the dominant negative transcription regulator CHOP with a novel gene FUS by translocation t(12;16) in malignant liposarcoma. *Nature Genetics* 4 (1993) 175-180
- [140] Rassow, J.; v. Ahsen, O.; Bömer, U.; Pfanner, N.: Molecular chaperones: towards a characterization of the heat-shock protein 70 family. *Trends in Cell Biology* 7 (1997) 129-133
- [141] Ristimäki, A.; Garfinkel, S.; Wessendorf, J.; Maciag, T.; Hla, T.: Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 α . Evidence for post-transcriptional regulation. *The Journal of Biological Chemistry* 269 (1994) 11769-11775
- [142] Rosoff, P. M.; Savage, N.; Dinarello, C. A.: Interleukin-1 stimulates diacylglycerol production in T lymphocytes by a novel mechanism. *Cell* 54 (1988) 73-81
- [143] Roth, J.; Bendayan, M.; Carlemalm, E.; Villiger, W.; Garavito, M.: Enhancement of structural preservation and immunocytochemical staining in low temperature embedded pancreatic tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 29 (1981) 663-669

- [144] Rothlein, R.; Czajkowski, M.; O'Neill, M. M.; Marlin, S. D.; Mainolfi, E.; Merluzzi, V. J.: Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary cell lines by pro-inflammatory cytokines. Regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies. *The Journal of Immunology* 141 (1988) 1665-1669
- [145] Saklatvala, J.; Rawlinson, L. M.; Marshall, C. J.; Kracht, M.: Interleukin 1 and tumour necrosis factor activate the mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase in cultured cells. *FEBS* 334 (1993) 189-192
- [146] Sanchez, E. R.; Hirst, M.; Scherrer, L. C.; Tang, H.-Y.; Welsh, M. J.; Harmon, J. M.; Simons, S. S.; Ringold, G. M.; Pratt, W. B.: Hormone-free mouse glucocorticoid receptors overexpressed in chinese hamster ovary cells are localized to the nucleus and are associated with both hsp70 and hsp90. *The Journal of Biological Chemistry* 265 (1990) 20123-20130
- [147] Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5463-5467
- [148] Scanlon, K. J.; Ohta, Y.; Ishida, H.; Kijima, H.; Ohkawa, T.; Kaminski, A.; Tsai, J.; Horng, G.; Kashani-Sabet, M.: Oligonucleotide-mediated modulation of mammalian gene expression. *FASEB Journal* 9 (1995) 1288-1296
- [149] Scapigliati, G.; Ghiara, P.; Bartalini, A.; Taglibue, A.; Boraschi, D.: Differential binding of IL-1 α and IL-1 β to receptors on B and T cells. *FEBS* 243 (1989) 394-398
- [150] Schneider, H.-C.; Berthold, J.; Bauer, M. F.; Dietmeier, K.; Guiard, B.; Brunner, M.; Neupert, W.: Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature* 371 (1994) 768-774
- [151] Shimizu, H.; Mitomo, K.; Watanabe, T.; Okamoto, S.; Yamamoto, K.-I.: Involvement of a NF- κ B-like transcription factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines. *Molecular and Cellular Biology* 10 (1990) 561-568
- [152] Sims, J. E.; March, C. J.; Cosman, D.; Widmer, M. B.; MacDonald, H. R.; McMahan, C. J.; Grubin, C. E.; Wignall, J.; Jackson, J. L.; Call, S. M.; Friend, D.; Alpert, A. R.; Gillis, S.; Urdal, D. L.; Dower, S. K.: cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* 241 (1988) 585-589
- [153] Sims, J. E.; Gayle, M. A.; Slack, J. L.; Alderson, M. R.; Bird, T. A.; Giri, J. G.; Colotta, F.; Re, F.; Mantovani, A.; Shanebeck, K.; Grabstein, K. H.; Dower, S. K.: Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 6155-6159
- [154] Sims, J. E., Bird, T. A., Mitcham, J. L.: IIP1: a Gap-like protein implicated in IL-1 signaling. (Meeting report) *Eur. Cytokine Netw.* 7 (1996) 199

-
- [155] Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J.; Klenk, D. C.: Measurement of protein using bicinchonic acid. *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76-85
- [156] Smith, D. F.; Faber, L. E.; Toft, D. O.: Purification of unactivated progesterone receptor and identification of novel receptor-associated proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 265 (1990) 3996-4003
- [157] Takata, Y.; Fujioka, M.: 5'-[p-(fluorosulfonyl)benzoyl]adenosine-mediated inactivation of S-Adenosylhomocysteinase. *Biochemistry* 23 (1984) 4357-4362
- [158] Taylor, S. I.; Moller, D. E.; *Insulin Resistance*, John Wiley and Sons, New York (1993) 83-111
- [159] Tewes, F.; Böhl, G.-F.; Brigelius-Flohé, R.: Thiol modification inhibits the interleukin (IL)-1-mediated activation of an IL-1 receptor-associated protein kinase and NF- κ B. *Eur. J. Immunol.* 27 (1997) 3015-3021
- [160] Tominaga, S.-I.: A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. *FEBS* 258 (1989) 301-304
- [161] Tsai, M.-Y.; Wang, C.: Uncoupling of peptide-stimulated ATPase and clathrin-uncoating activity in deletion mutant of hsc70. *The Journal of Biological Chemistry* 269 (1994) 5958-5962
- [162] VanBursik, A.; Crump, B. L.; Margoliash, E.; Pierce, S. K: A peptide binding protein having a role in antigen presentation is a member of the Hsp70 heat shock family. *J. Exp. Med.* 170 (1989) 1799-1809
- [163] VanBursik, A. M.; DeNagel, D. C.; Guagliardi, L. E.; Brodsky, F. M.; Pierce, S. K.: Cellular and subcellular distribution of PBP72/74, a peptide-binding protein that plays a role in antigen processing. *The Journal of Immunology* 146 (1991) 500-506
- [164] Von Hoegen, I.; Falk, W.; Kojouharoff, G.; Krammer, P. H.: Internalization of interleukin 1 (IL 1) correlates with IL 1-induced IL 2 receptor expression and IL 2 secretion of EL4 thymoma cells. *Eur. J. Immunol.* 19 (1989) 329-334
- [165] Voos, W.; von Ahsen, O.; Müller, H.; Guiard, B.; Rassow, J.; Pfanner, N.: Differential requirement for the mitochondrial Hsp70-Tim44 complex in unfolding and translocation of preproteins. *The EMBO Journal* 15 (1996) 2668-2677
- [166] Wadhwa, R.; Kaul, S. C.; Ikawa, Y.; Sugimoto, Y.: Identification of a novel member of mouse hsp70 family. *The Journal of Biological Chemistry* 268 (1993) 6615-6621

- [167] Wadhwa, R.; Kaul, S. C.; Sugimoto, Y.; Mitsui, Y.: Induction of cellular senescence by transfection of cytosolic mortalin cDNA in NIH 3T3 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 268 (1993) 22239-22242
- [168] Wadhwa, R.; Akiyama, S.; Sugihara, T.; Reddel, R. R.; Mitsui, Y.; Kaul, S. C.: Genetic differences between the pancytosolic and perinuclear forms of murine mortalin. *Experimental Cell Research* 266 (1996) 381-386
- [169] Wang, T.-F.; Chang, J.-H.; Wang, C.: Identification of the peptide binding domain of hsc70. *The Journal of Biological Chemistry* 268 (1993) 26049-26051
- [170] Weitzmann, M. N.; Savage, N.: Nuclear internalisation and DNA binding activities of interleukin-1, interleukin-1 receptor and interleukin-1/receptor complexes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 187 (1992) 1166-1171
- [171] Wesche, H.; Korherr, C.; Kracht, M.; Falk, W.; Resch, K.; Martin, M. U.: The interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1AcP) is essential for IL-1-induced activation of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) and stress-activated protein kinases (SAP kinases). *The Journal of Biological Chemistry* 272 (1997) 7727-7731
- [172] Wilmer, W. A.; Tan, L. C.; Dickerson, J. A.; Danne, M.; Rovin, B. H.: Interleukin-1 β induction of mitogen-activated protein kinases in human mesangial cells. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (1997) 10877-10881
- [173] Witt, J.; Roskoski, R.: Rapid protein kinase assay using phosphocellulose-paper absorption. *Analytical Biochemistry* 66 (1975) 253-258
- [174] Wyatt, J. L.; Colman, R. F.: Affinity labeling of rabbit muscle pyruvate kinase by 5'-p-fluorosulfonylbenzoyladenosine. *Biochemistry* 16 (1977) 1333-1342
- [175] Yanagisawa, K.; Takagi, T.; Tsukamoto, T.; Tetsuka, T.; Tominaga, S.-I.: Presence of a novel primary response gene ST2L, encoding a product highly similar to the interleukin 1 receptor type 1. *FEBS* 318 (1993) 83-87
- [176] Yarden, Y.; Schlessinger, J.: Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* 26 (1987) 1443-1451
- [177] Zamecnik, P. C.; Stephenson, M. L.: Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 280-284
- [178] Zhang, Y.; Lin, J.-X.; Yip, Y. K.; Vilček, J.: Enhancement of cAMP levels and of protein kinase activity by tumor necrosis factor and interleukin 1 in human fibroblasts: Role in the induction of interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 6802-6805

-
- [179] Zhang, Y.; Lin, J.-X.; Vilček, J.: Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear factor binding to a κ B-like sequence. *Molecular and Cellular Biology* 10 (1990) 3818-3823
- [180] Zhou, J.; Mulshine, J. L.; Unsworth, E. J.; Scott, F. M.; Avis, I. M.; Vos, M. D.; Treston, A. M.: Purification and characterization of a protein that permits early detection of lung cancer. *The Journal of Biological Chemistry* 271 (1996) 10760-10766
- [181] Zhu, W.; Zhao, X.; Burkholder, W. F.; Gragerov, A.; Ogata, C. M.; Gottesman, M. E.; Hendrickson, W. A.: Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 272 (1996) 1606-1614
- [182] Zoller, M. J.; Taylor, S. S.: Affinity labeling of the nucleotide binding site of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase using p-fluorosulfonyl-[14 C]benzoyl 5'-adenosine. *The Journal of Biological Chemistry* 254 (1979) 8363-8368
- [183] Zucali, J. R.; Dinarello, C. A.; Oblon, D. J.; Gross, M. A.; Anderson, L.; Weiner, R. S.: Interleukin 1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E₂. *J. Clin. Invest.* 77 (1986) 1857
- [184] Zucali, J. R.; Boxmeyer, H. E.; Dinarello, C. A.; Gross, M. A.; Weiner, R. S.: Regulation of early human hematopoietic (BFU-E and CFU-GEMM) progenitor cells *in vitro* by interleukin-1-induced fibroblast-conditioned medium. *Blood* 69 (1987) 33-37

7 Anhang

7.1 Auflistung der verschiedene *E. coli*-Klone

GSPBP20/1	Pos. 156 - 1411 (murine Sequenz von Mot-3) in <i>Sense</i> -Orientierung in pCRII RT-PCR U1/R1
GSPBP16/1	Pos. 156 - 1411 (murine Sequenz von Mot-3) in <i>Antisense</i> -Orientierung in pCRII RT-PCR U1/R1
GSPBP7/2	Pos. -14 - 2054 (murine Sequenz von Mot-3) in <i>Sense</i> -Orientierung in pCRII RT-PCR U3/R3
GSPBP10/2	Pos. -14 - 2054 (murine Sequenz von Mot-3) in <i>Antisense</i> -Orientierung in pCRII RT-PCR U3/R3
GSPBP4/3	Pos. 156 - 501 (humane Sequenz von Mortalin) in <i>Antisense</i> -Orientierung in pCRII RT-PCR U1/R5 (mit BamHI-Schnittstelle)
GSASH2/2	Pos. 156 - 501 (humane Sequenz von Mortalin) in <i>Antisense</i> -Orientierung in pcDNA3
GSATP5/8	Pos. -14 - 1521 (murine Sequenz von Mot-3) in <i>Sense</i> -Orientierung in pcDNA3
GSSUB9/9	Pos. 1041 - 2054 (murine Sequenz von Mot-3) in <i>Sense</i> -Orientierung in pcDNA3

7.2 Abkürzungen in den Bezeichnungen der eukaryontischen Zellklone

V	=	leerer Vektor
AS	=	<i>Antisense</i>
ATP	=	ATPase-Domäne
SUB	=	Substraterkennungsdomäne

7.3 Sequenzen

```

-14                                     TCTGTCCAGCCACC
AS                                     -----+----- -1
                                     - - - -

1
AS 1  ATGATAAGCGCCAGCAGAGCCGCGGCCGCGCGTCTCGTGGGCACCGCTGCGTCCCGGAGC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
1  M I S A S R A A A A R L V G T A A S R S
    Präsequenz →

61
AS 21 CCCGCAGCCGCGCCGTCCCCAGGATGGCTGGAATGGCCTTAGCCATGAGGCTTTTAGATTT
21 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
21 P A A A R P Q D G W N G L S H E A F R F

121
AS 41 GTTTCAGAAGAGATTATGCATCAGAAGCAATCAAGGGTGCAGTGGTTGGTATTGATTTG
41 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
41 V S R R D Y A S E A I K G A V V G I D L
    ← Präsequenz | ATPase-Domäne →

181
AS 61 GGTACTACTAACTCCTGTGTGGCTGTTATGGAGGGCAAACAAGCAAAGGTCCTGGAGAAT
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
61 G T T N S C V A V M E G K Q A K V L E N

241
AS 81 GCTGAAGGTGCCAGAACTACCCCTTCTGTGGTTGCCTTTACAGCAGATGGAGAACGACTT
81 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
81 A E G A R T T P S V V A F T A D G E R L

301
AS 101 GTTGGTATGCCAGCAAAACGGCAAGCTGTCACCAATCCAAACAATACCTTCTATGCTACT
101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
101 V G M P A K R Q A V T N P N N T F Y A T

361
AS 121 AAGCGTCTTATTGGACGACGATATGATGACCCTGAAGTACAGAAAGACACTAAGAATGTT
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
121 K R L I G R R Y D D P E V Q K D T K N V

421
AS 141 CCTTTTAAAATTGTCCGTGCCTCCAATGGTGATGCTTGGGTTGAGGCTCATGGAAAAC
141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
141 P F K I V R A S N G D A W V E A H G K L

481
AS 161 TATTCTCCAAGTCAGATTGGAGCATTTGTGTTGATGAAGATGAAAGAGACTGCAGAAAA
161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
161 Y S P S Q I G A F V L M K M K E T A E N

```

```

      TACTTGGGCCACACAGCAAAAAATGCTGTGATCACAGTCCCTGCTTATTTCAATGATTCA
AS  541 -----+-----+-----+-----+-----+ 600
      181 Y L G H T A K N A V I T V P A Y F N D S

              EcoRV
              |
      CAGCGACAGGCCACTAAGGATGCTGGCCAGATATCTGGGCTAAATGTGCTTCGAGTGATC
AS  601 -----+-----+-----+-----+-----+ 660
      201 Q R Q A T K D A G Q I S G L N V L R V I

      AATGAGCCTACAGCTGCTGCTCTAGCTTACGGTCTGGACAAATCTGAAGATAAAGTCATT
AS  661 -----+-----+-----+-----+-----+ 720
      221 N E P T A A A L A Y G L D K S E D K V I

      GCTGTGTATGATTTAGGTGGTGGAAACCTTTGACATTTCTATCCTGGAAATTCAGAAAGGA
AS  721 -----+-----+-----+-----+-----+ 780
      241 A V Y D L G G G T F D I S I L E I Q K G

      GTGTTTGAGGTGAAATCTACCAATGGGGACACTTTCTTAGGAGGGGAAGACTTTGACCAA
AS  781 -----+-----+-----+-----+-----+ 840
      261 V F E V K S T N G D T F L G G E D F D Q

      GCTTTGTTGCGGCACATTGTCAAGGAGTTCAAGAGAGAGACAGGGGTTGATTTGACCAAA
AS  841 -----+-----+-----+-----+-----+ 900
      281 A L L R H I V K E F K R E T G V D L T K

      GACAACATGGCGCTTCAGAGGGTTTCGGGAAGCTGCTGAGAAGGCTAAATGTGAACTTTCC
AS  901 -----+-----+-----+-----+-----+ 960
      301 D N M A L Q R V R E A A E K A K C E L S

      TCATCTGTGCAGACTGACATCAACTTGCCATACCTTACCATGGATGCTTCTGGACCAAAG
AS  961 -----+-----+-----+-----+-----+ 1020
      321 S S V Q T D I N L P Y L T M D A S G P K

              XhoI
              |
      CATTGGAATATGAAGCTGACTCGAGCTCAGTTTGAAGGCATTGTCACAGATCTAATCAAG
AS  1021 -----+-----+-----+-----+-----+ 1080
      341 H L N M K L T R A Q F E G I V T D L I K

      AGAACTATTGCTCCGTGTCAGAAAGCTATGCAGGATGCAGAAAGTCAGCAAGAGTGACATA
AS  1081 -----+-----+-----+-----+-----+ 1140
      361 R T I A P C Q K A M Q D A E V S K S D I

      GGAGAAGTGATTCTGGTTGGTGGCATGACAAGGATGCCCAAGGTTTCAGCAGACTGTACAA
AS  1141 -----+-----+-----+-----+-----+ 1200
      381 G E V I L V G G M T R M P K V Q Q T V Q

```

```

      GATCTTTTTGGCAGAGCCCCGAGTAAAGCTGTTAATCCTGATGAGGCTGTAGCCATCGGA
1201  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
AS 401 D L F G R A P S K A V N P D E A V A I G

      GCTGCCATCCAGGGAGGTGTGTTGGCTGGTGACGTTACAGACGTGCTGCTCCTGGATGTC
1261  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
AS 421 A A I Q G G V L A G D V T D V L L L D V
      ← ATPase-Domäne | Substraterkennungs-

      ACTCCCCTCTCTCTGGGTATTGAGACTCTGGGAGGCGTCTTTACCAAACCTTATTAATAGG
1321  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
AS 441 T P L S L G I E T L G G V F T K L I N R
      domäne →

      AACACCACTATTCCAACCAAAAAGAGCCAGGTGTTTTCTACTGCTGCTGATGGACAAACT
1381  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
AS 461 N T T I P T K K S Q V F S T A A D G Q T

      CAAGTAGAGATTAAAGTGTGTCAGGGGGAACGAGAGATGGCTGGAGACAACAAACTTCTA
1441  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
AS 481 Q V E I K V C Q G E R E M A G D N K L L

      EcoRI
      |
      GGACAGTTCACTTTGATTGGAATTCCCCCAGCCCCCTCGTGGAGTGCCCCAGATTGAAGTT
1501  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
AS 501 G Q F T L I G I P P A P R G V P Q I E V

      ACATTTGACATTGATGCCAATGGGATTGTGCACGTTTCTGCCAAAGATAAAGGCACTGGT
1561  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
AS 521 T F D I D A N G I V H V S A K D K G T G

      CGTGAGCAACAGATTGTAATCCAGTCTTCTGGTGGATTAAAGCAAAGATGATATTGAAAAT
1621  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
AS 541 R E Q Q I V I Q S S G G L S K D D I E N

      ATGGTTAAAAATGCAGAGAAGTACGCTGAGGAAGACCGCAGGAAGAAGGAACGTGTTGAA
1681  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740
AS 561 M V K N A E K Y A E E D R R K K E R V E

      GCAGTTAATATGGCTGAAGGAATTATTCATGACACAGAAAACCAAGATGGAAGAATTTAAG
1741  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800
AS 581 A V N M A E G I I H D T E T K M E E F K
      ← Substr.-domäne | Oligomerisationsdomäne →

      GACCAGTTGCCTGCTGATGAGTGCAACAAGCTAAAGGAAGAGATTTCCAAAATGAGAGCG
1801  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860
AS 601 D Q L P A D E C N K L K E E I S K M R A

```


Abbildung 58: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz (kursive Schreibweise) von mot-3. Relevante Restriktionsstellen und die Domänenstruktur sind gekennzeichnet.

	-90					-41
Mot1	CGTTTCCAGA	AGCGTAGCAC	CACCGTGCAC	GCAGCTCCGG	GCCCGT .GGG	
Mot2	CGTTTCCAGA	AGCGTAGCAC	CACCGTGCAC	GCAGCTCCGG	GCCCGT .GGG	
Mot3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
Pbp74	~~~~CCAGAA	GCGTACGCAC	CACCGTGCAC	GCAGCTCCGG	GCCCGTGGGG	
Gr75	GGTTTCCAGA	AGCGCTGCCG	CCACCGCATC	GCGCAGCTCT	TTGCCGTCGG	
	40					+1 10
Mot1	TGTTGGTTCT	TGCCCTCGTA	ACCCCTCTG	TCCAGCCACC	ATGATAAGCG	
Mot2	TGTTGGTTCT	TGCCCTCGTA	ACCCCTCTG	TCCAGCCACC	ATGATAAGCG	
Mot3	~~~~~	~~~~~	~~~~~TCTG	TCCAGCCACC	ATGATAAGCG	
Pbp74	TGTTGGTTCT	TGCCCTCGTA	ACCCCTCTG	TCCAGCCACC	ATGATAAGCG	
Gr75	AGCGCTTGTT	TGCTGCCTCG	TACTCCTCCA	TTTATCCGCC	ATGATAAGTG	
	11					60
Mot1	CCAGCAGAGC	CGCGGCCGCG	CGTCTCGTGG	GCACCGCTGC	GTCCCGGAGC	
Mot2	CCAGCAGAGC	CGCGGCCGCG	CGTCTCGTGG	GCACCGCTGC	GTCCCGGAGC	
Mot3	CCAGCAGAGC	CGCGGCCGCG	CGTCTCGTGG	GCACCGCTGC	GTCCCGGAGC	
Pbp74	CCAGCAGAGC	CGCGGCCGCG	CGTCTCGTGG	GCACCGCTGC	GTCCCGGAGC	
Gr75	CCAGCCGAGC	TGCAGCAGCC	CGTCTCGTGG	GCGCCGCAGC	CTCCCGGGGC	
	61					110
Mot1	CCCGCAGCCG	CCCGTCCCCA	GGATGGCTGG	AATGGCCTTA	GCCATGAGGC	
Mot2	CCCGCAGCCG	CCCGTCCCCA	GGATGGCTGG	AATGGCCTTA	GCCATGAGGC	
Mot3	CCCGCAGCCG	CCCGTCCCCA	GGATGGCTGG	AATGGCCTTA	GCCATGAGGC	
Pbp74	CCCGCAGCCG	CCCGTCCCCA	GGATGGCTGG	AATGGCCTTA	GCCATGAGGC	
Gr75	CCTACGGCCG	CCCGCCACCA	GGATAGCTGG	AATGGCCTTA	GTCATGAGGC	

	111				160
Mot1	TTTTAGATTT	GTTTCAAGAA	GAGATTATGC	ATCAGAAGCA	ATCAAGGGTG
Mot2	TTTTAGATTT	GTTTCAAGAA	GAGATTATGC	ATCAGAAGCA	ATCAAGGGTG
Mot3	TTTTAGATTT	GTTTCAAGAA	GAGATTATGC	ATCAGAAGCA	ATCAAGGGTG
Pbp74	TTTTAGATTT	GTTTCAAGAA	GAGATTATGC	ATCAGAAGCA	ATCAAGGGTG
Gr75	TTTTAGACTT	GTTTCAAGGC	GGGATTATGC	ATCAGAAGCA	ATCAAGGGAG
	161				210
Mot1	CAGTGGTTGG	TATTGATTTG	GGTACTACTA	ACTCCTGTGT	GGCTGTTATG
Mot2	CAGTGGTTGG	TATTGATTTG	GGTACTACTA	ACTCCTGTGT	GGCTGTTATG
Mot3	CAGTGGTTGG	TATTGATTTG	GGTACTACTA	ACTCCTGTGT	GGCTGTTATG
Pbp74	CAGTGGTTGG	TATTGATTTG	GGTACTACTA	ACTCCTGTGT	GGCTGTTATG
Gr75	CAGTTGTTGG	TATTGATTTG	GGTACTACCA	ACTCCTGCGT	GGCAGTTATG
	211				260
Mot1	GAGGGCAAAC	AAGCAAAGGT	CCTGGAGAAT	GCTGAAGGTG	CCAGAACTAC
Mot2	GAGGGCAAAC	AAGCAAAGGT	CCTGGAGAAT	GCTGAAGGTG	CCAGAACTAC
Mot3	GAGGGCAAAC	AAGCAAAGGT	CCTGGAGAAT	GCTGAAGGTG	CCAGAACTAC
Pbp74	GAGGGCAAAC	AAGCAAAGGT	CCTGGAGAAT	GCTGAAGGTG	CCAGAACTAC
Gr75	GAAGGTAAAC	AAGCAAAGGT	GCTGGAGAAT	GCTGAAGGTG	CCAGAACCAC
	261				310
Mot1	CCCTTCTGTG	GTTGCCTTTA	CAGCAGATGG	AGAACGACTT	GTTGGTATGC
Mot2	CCCTTCTGTG	GTTGCCTTTA	CAGCAGATGG	AGAACGACTT	GTTGGTATGC
Mot3	CCCTTCTGTG	GTTGCCTTTA	CAGCAGATGG	AGAACGACTT	GTTGGTATGC
Pbp74	CCCTTCTGTG	GTTGCCTTTA	CAGCAGATGG	AGAACGACTT	GTTGGTATGC
Gr75	CCCTTCAGTT	GTGGCCTTTA	CAGCAGATGG	TGAGCGACTT	GTTGGAATGC
	311				360
Mot1	CAGCAA A ACG	GCAAGCTGTC	ACCAATCCAA	ACAATACCTT	CTATGCTACT
Mot2	CAGCAA A ACG	GCAAGCTGTC	ACCAATCCAA	ACAATACCTT	CTATGCTACT
Mot3	CAGCAA A ACG	GCAAGCTGTC	ACCAATCCAA	ACAATACCTT	CTATGCTACT
Pbp74	CAGCAAG A CG	GCAAGCTGTC	ACCAATCCAA	ACAATACCTT	CTATGCTACT
Gr75	CGGCCAAGCG	ACAGGCTGTC	ACCAACCCAA	ACAATACATT	TTATGCTACC
	361				410
Mot1	AAGCGT A TTA	TTGGACGACG	ATATGATGAC	CCTGAAGTAC	AGAAAGACAC
Mot2	AAGCGT A TTA	TTGGACGACG	ATATGATGAC	CCTGAAGTAC	AGAAAGACAC
Mot3	AAGCGT C TTA	TTGGACGACG	ATATGATGAC	CCTGAAGTAC	AGAAAGACAC
Pbp74	AAGCGT C TTA	TTGGACGACG	ATATGATGAC	CCTGAAGTAC	AGAAAGACAC
Gr75	AAGCGTCTCA	TTGGCCGGCG	ATATGATGAT	CCTGAAGTAC	AGAAAGACAT
	411				460
Mot1	TAAGAATGTT	CCTTTTAAAA	TTGTCCGTGC	CTCCAATGGT	GATGCTTGGG
Mot2	TAAGAATGTT	CCTTTTAAAA	TTGTCCGTGC	CTCCAATGGT	GATGCTTGGG
Mot3	TAAGAATGTT	CCTTTTAAAA	TTGTCCGTGC	CTCCAATGGT	GATGCTTGGG
Pbp74	TAAGAATGTT	CCTTTTAAAA	TTGTCCGTGC	CTCCAATGGT	GATGCTTGGG
Gr75	TAAAAATGTT	CCCTTTAAAA	TTGTCCGTGC	CTCCAATGGT	GATGCCTGGG

	461				510
Mot1	TTGAGGCTCA	TGGAAAACCTC	TATTCTCCAA	GTCAGATTGG	AGCATTTGTG
Mot2	TTGAGGCTCA	TGGAAAACCTC	TATTCTCCAA	GTCAGATTGG	AGCATTTGTG
Mot3	TTGAGGCTCA	TGGAAAACCTC	TATTCTCCAA	GTCAGATTGG	AGCATTTGTG
Pbp74	TTGAGGCTCA	TGGAAAACCTC	TATTCTCCAA	GTCAGATTGG	AGCATTTGTG
Gr75	TTGAGGCTCA	TGGGAAATTG	TATTCTCCGA	GTCAGATTGG	AGCATTTGTG
	511				560
Mot1	TTGATGAAGA	TGAAAGAGAC	TGCAGAAAAT	TACTTGGGCC	ACACAGCAAA
Mot2	TTGATGAAGA	TGAAAGAGAC	TGCAGAAAAT	TACTTGGGCC	ACACAGCAAA
Mot3	TTGATGAAGA	TGAAAGAGAC	TGCAGAAAAT	TACTTGGGCC	ACACAGCAAA
Pbp74	TTGATGAAGA	TGAAAGAGAC	TGCAGAAAAT	TACTTGGGCC	ACACAGCAAA
Gr75	TTGATGAAGA	TGAAAGAGAC	TGCAGAAAAT	TACTTGGGGC	ACACAGCAAA
	561				610
Mot1	AAATGCTGTG	ATCACAGTCC	CTGCTTATTT	CAATGATTCA	CAGCGACAGG
Mot2	AAATGCTGTG	ATCACAGTCC	CTGCTTATTT	CAATGATTCA	CAGCGACAGG
Mot3	AAATGCTGTG	ATCACAGTCC	CTGCTTATTT	CAATGATTCA	CAGCGACAGG
Pbp74	AAATGCTGTG	ATCACAGTCC	CTGCTTATTT	CAATGATTCA	CAGCGACAGG
Gr75	AAATGCTGTG	ATCACAGTCC	CAGCTTATTT	CAATGACTCG	CAGAGACAGG
	611				660
Mot1	CCACTAAGGA	TGCTGGCCAG	ATATCTGGGC	TAAATGTGCT	TCGAGTGATC
Mot2	CCACTAAGGA	TGCTGGCCAG	ATATCTGGGC	TAAATGTGCT	TCGAGTGATC
Mot3	CCACTAAGGA	TGCTGGCCAG	ATATCTGGGC	TAAATGTGCT	TCGAGTGATC
Pbp74	CCACTAAGGA	TGCTGGCCAG	ATATCTGGGC	TAAATGTGCT	TCGAGTGATC
Gr75	CCACTAAAGA	TGCTGGCCAG	ATATCTGGAC	TGAATGTGCT	TCGGGTGATT
	661				710
Mot1	AATGAGCCTA	CAGCTGCTGC	TCTAGCTTAC	GGTCTGGACA	AATCTGAAGA
Mot2	AATGAGCCTA	CAGCTGCTGC	TCTAGCTTAC	GGTCTGGACA	AATCTGAAGA
Mot3	AATGAGCCTA	CAGCTGCTGC	TCTAGCTTAC	GGTCTGGACA	AATCTGAAGA
Pbp74	AATGAGCCTA	CAGCTGCTGC	TCTAGCTTAC	GGTCTGGACA	AATCTGAAGA
Gr75	AATGAGCCCA	CAGCTGCTGC	TCTTGCCCTAT	GGTCTAGACA	AATCAGAAGA
	711				760
Mot1	TAAAGTCATT	GCTGTGTATG	ATTTAGGTGG	TGGAACCTTT	GACATTTCTA
Mot2	TAAAGTCATT	GCTGTGTATG	ATTTAGGTGG	TGGAACCTTT	GACATTTCTA
Mot3	TAAAGTCATT	GCTGTGTATG	ATTTAGGTGG	TGGAACCTTT	GACATTTCTA
Pbp74	TAAAGTCATT	GCTGTGTATG	ATTTAGGTGG	TGGAACCTTT	GACATTTCTA
Gr75	CAAAGTCATT	GCTGTATATG	ATTTAGGTGG	TGGAACCTTT	GATATTTCTA
	761				810
Mot1	TCCTGGAAAT	TCAGAAAGGA	GTGTTTGAGG	TGAAATCTAC	CAATGGGGAC
Mot2	TCCTGGAAAT	TCAGAAAGGA	GTGTTTGAGG	TGAAATCTAC	CAATGGGGAC
Mot3	TCCTGGAAAT	TCAGAAAGGA	GTGTTTGAGG	TGAAATCTAC	CAATGGGGAC
Pbp74	TCCTGGAAAT	TCAGAAAGGA	GTGTTTGAGG	TGAAATCTAC	CAATGGGGAC
Gr75	TCCTGGAAAT	TCAGAAAGGA	GTATTTGAGG	TGAAATCCAC	AAATGGGGAT

	811				860
Mot1	ACTTTCTTAG	GAGGGGAAGA	CTTTGACCAA	GCTTTGTTGC	GGCACATTGT
Mot2	ACTTTCTTAG	GAGGGGAAGA	CTTTGACCAA	GCTTTGTTGC	GGCACATTGT
Mot3	ACTTTCTTAG	GAGGGGAAGA	CTTTGACCAA	GCTTTGTTGC	GGCACATTGT
Pbp74	ACTTTCTTAG	GAGGGGAAGA	CTTTGACCAA	GCTTTGTTGC	GGCACATTGT
Gr75	ACCTTCTTAG	GTGGGGAAGA	CTTTGACCAG	GCCTTGCTAC	GGCACATTGT
	861				910
Mot1	CAAGGAGTTC	AAGAGAGAGA	CAGGGGTGGA	TTTGACCAAA	GACAACATGG
Mot2	CAAGGAGTTC	AAGAGAGAGA	CAGGGGTGGA	TTTGACCAAA	GACAACATGG
Mot3	CAAGGAGTTC	AAGAGAGAGA	CAGGGGTGGA	TTTGACCAAA	GACAACATGG
Pbp74	CAAGGAGTTC	AAGAGAGAGA	CAGGGGTGGA	TTTGACCAAA	GACAACATGG
Gr75	GAAGGAGTTC	AAGAGAGAGA	CAGGGGTGGA	TTTGACTAAA	GACAACATGG
	911				960
Mot1	CGCTTCAGAG	GGTTCGGGAA	GCTGCTGAGA	AGGCTAAATG	TGAACTTTCC
Mot2	CGCTTCAGAG	GGTTCGGGAA	GCTGCTGAGA	AGGCTAAATG	TGAACTTTCC
Mot3	CGCTTCAGAG	GGTTCGGGAA	GCTGCTGAGA	AGGCTAAATG	TGAACTTTCC
Pbp74	CGCTTCAGAG	GGTTCGGGAA	GCTGCTGAGA	AGGCTAAATG	TGAACTTTCC
Gr75	CACTTCAGAG	GGTACGGGAA	GCTGCTGAAA	AGGCTAAATG	TGAACTCTCC
	961				1010
Mot1	TCATCTGTGC	AGACTGACAT	CAACTTGCCA	TACCTTACCA	TGGATGCTTC
Mot2	TCATCTGTGC	AGACTGACAT	CAACTTGCCA	TACCTTACCA	TGGATGCTTC
Mot3	TCATCTGTGC	AGACTGACAT	CAACTTGCCA	TACCTTACCA	TGGATGCTTC
Pbp74	TCATCTGTGC	AGACTGACAT	CAACTTGCCA	TACCTTACCA	TGGATGCTTC
Gr75	TCATCTGTGC	AGACTGACAT	CAATTTGCCC	TATCTTACAA	TGGATTCTTC
	1011				1060
Mot1	TGGACCAAAG	CATTTGAATA	TGAAGCTGAC	TCGAGCTCAG	TTTGAAGGCA
Mot2	TGGACCAAAG	CATTTGAATA	TGAAGCTGAC	TCGAGCTCAG	TTTGAAGGCA
Mot3	TGGACCAAAG	CATTTGAATA	TGAAGCTGAC	TCGAGCTCAG	TTTGAAGGCA
Pbp74	TGGACCAAAG	CATTTGAATA	TGAAGCTGAC	TCGAGCTCAG	TTTGAAGGCA
Gr75	TGGACCCAAG	CATTTGAATA	TGAAGTTGAC	CCGTGCTCAA	TTTGAAGGGA
	1061				1110
Mot1	TTGTCACAGA	TCTAATCAAG	AGAACTATTG	CTCCGTGTCA	GAAAGCTATG
Mot2	TTGTCACAGA	TCTAATCAAG	AGAACTATTG	CTCCGTGTCA	GAAAGCTATG
Mot3	TTGTCACAGA	TCTAATCAAG	AGAACTATTG	CTCCGTGTCA	GAAAGCTATG
Pbp74	TTGTCACAGA	TCTAATCAAG	AGAACTATTG	CTCCGTGTCA	GAAAGCTATG
Gr75	TTGTCACTGA	TCTAATCAGA	AGGACTATCG	CTCCATGCCA	AAAAGCTATG
	1111				1160
Mot1	CAGGATGCAG	AAGTCAGCAA	GAGTGACATA	GGAGAAGTGA	TTCTGGTTGG
Mot2	CAGGATGCAG	AAGTCAGCAA	GAGTGACATA	GGAGAAGTGA	TTCTGGTTGG
Mot3	CAGGATGCAG	AAGTCAGCAA	GAGTGACATA	GGAGAAGTGA	TTCTGGTTGG
Pbp74	CAGGATGCAG	AAGTCAGCAA	GAGTGACATA	GGAGAAGTGA	TTCTGGTTGG
Gr75	CAAGATGCAG	AAGTCAGCAA	GAGTGACATA	GGAGAAGTGA	TTCTTGTGGG

	1161				1210
Mot1	TGGCATGACA	AGGATGCCCCA	AGGTTTCAGCA	GACTGTACAA	GATCTTTTTTG
Mot2	TGGCATGACA	AGGATGCCCCA	AGGTTTCAGCA	GACTGTACAA	GATCTTTTTTG
Mot3	TGGCATGACA	AGGATGCCCCA	AGGTTTCAGCA	GACTGTACAA	GATCTTTTTTG
Pbp74	TGGCATGACA	AGGATGCCCCA	AGGTTTCAGCA	GACTGTACAA	GATCTTTTTTG
Gr75	TGGCATGACT	AGGATGCCCCA	AGGTTTCAGCA	GACTGTACAG	GATCTTTTTTG
	1211				1260
Mot1	GCAGAGCCCC	GAGTAAAGCT	GTTAATCCTG	ATGAGGCTGT	AGCCATCGGA
Mot2	GCAGAGCCCC	GAGTAAAGCT	GTTAATCCTG	ATGAGGCTGT	AGCCATCGGA
Mot3	GCAGAGCCCC	GAGTAAAGCT	GTTAATCCTG	ATGAGGCTGT	AGCCATCGGA
Pbp74	GCAGAGCCCC	GAGTAAAGCT	GTTAATCCTG	ATGAGGCTGT	AGCCATCGGA
Gr75	GCAGAGCCCC	AAGTAAAGCT	GTCAATCCTG	ATGAGGCTGT	GGCCATTGGA
	1261				1310
Mot1	GCTGCCATCC	AGGGAGGTGT	GTTGGCTGGT	GACGTTACAG	ACGTGCTGCT
Mot2	GCTGCCATCC	AGGGAGGTGT	GTTGGCTGGT	GACGTTACAG	ACGTGCTGCT
Mot3	GCTGCCATCC	AGGGAGGTGT	GTTGGCTGGT	GACGTTACAG	ACGTGCTGCT
Pbp74	GCTGCCATCC	AGGGAGGTGT	GTTGGCTGGT	GACGTTACAG	ACGTGCTGCT
Gr75	GCTGCCATTG	AGGGAGGTGT	GTTGGCCGGC	GATGTCACGG	ATGTGCTGCT
	1311				1360
Mot1	CCTGGATGTC	ACTCCCCTCT	CTCTGGGTAT	TGAGACTCTG	GGAGGCGTCT
Mot2	CCTGGATGTC	ACTCCCCTCT	CTCTGGGTAT	TGAGACTCTG	GGAGGCGTCT
Mot3	CCTGGATGTC	ACTCCCCTCT	CTCTGGGTAT	TGAGACTCTG	GGAGGCGTCT
Pbp74	CCTGGATGTC	ACTCCCCTCT	CTCTGGGTAT	TGAGACTCTG	GGAGGCGTCT
Gr75	CCTTGATGTC	ACTCCCCTGT	CTCTGGGTAT	TGAAACTCTA	GGAGGTGTCT
	1361				1410
Mot1	TTACCAAACCT	TATTAATAGG	AACACCACTA	TTCCAACCAA	AAAGAGCCAG
Mot2	TTACCAAACCT	TATTAATAGG	AACACCACTA	TTCCAACCAA	AAAGAGCCAG
Mot3	TTACCAAACCT	TATTAATAGG	AACACCACTA	TTCCAACCAA	AAAGAGCCAG
Pbp74	TTACCAAACCT	TATTAATAGG	AACACCACTA	TTCCAACCAA	AAAGAGCCAG
Gr75	TTACCAAACCT	TATTAATAGG	AATACCACTA	TTCCAACCAA	GAAGAGCCAG
	1411				1460
Mot1	GTGTTTTCTA	CTGCTGCTGA	TGGACAAACT	CAAGTAGAGA	TTAAAGTGTG
Mot2	GTGTTTTCTA	CTGCTGCTGA	TGGACAAACT	CAAGTAGAGA	TTAAAGTGTG
Mot3	GTGTTTTCTA	CTGCTGCTGA	TGGACAAACT	CAAGTAGAGA	TTAAAGTGTG
Pbp74	GTGTTTTCTA	CTGCTGCTGA	TGGACAAACT	CAAGTAGAGA	TTAAAGTGTG
Gr75	GTATTCTCTA	CTGCCGCTGA	TGGTCAAACG	CAAGTGGAAG	TTAAAGTGTG
	1461				1510
Mot1	TCAGGGGGAA	CGAGAGATGG	CTGGAGACAA	CAAACCTTCTA	GGACAGTTCA
Mot2	TCAGGGGGAA	CGAGAGATGG	CTGGAGACAA	CAAACCTTCTA	GGACAGTTCA
Mot3	TCAGGGGGAA	CGAGAGATGG	CTGGAGACAA	CAAACCTTCTA	GGACAGTTCA
Pbp74	TCAGGGGGAA	CGAGAGATGG	CTGGAGACAA	CAAACCTTCTA	GGACAGTTCA
Gr75	TCAGGGGTGAA	AGAGAGATGG	CTGGAGACAA	CAAACCTCCTT	GGACAGTTTA

	1511				1560
Mot1	CTTTGATTGG	AATTCCCCCA	GCCCCTCGTG	GAGTGCCCCA	GATTGAAGTT
Mot2	CTTTGATTGG	AATTCCCCCA	GCCCCTCGTG	GAGTGCCCCA	GATTGAAGTT
Mot3	CTTTGATTGG	AATTCCCCCA	GCCCCTCGTG	GAGTGCCCCA	GATTGAAGTT
Pbp74	CTTTGATTGG	AATTCCCCCA	GCCCCTCGTG	GAGTGCCCCA	GATTGAAGTT
Gr75	CTTTGATTGG	AATTCCACCA	GCCCCTCGTG	GAGTTCCTCA	GATTGAAGTT
	1561				1610
Mot1	ACAT TT GACA	TTGAT G CCAA	TGGGATTGTG	CACGTTTCTG	CCAAAGATAA
Mot2	ACAT TT GACA	TTGAT G CCAA	TGGGATTGTG	CACGTTTCTG	CCAAAGATAA
Mot3	ACAT TT GACA	TTGAT G CCAA	TGGGATTGTG	CACGTTTCTG	CCAAAGATAA
Pbp74	ACAT C TGACA	TTGAT C GCCAA	TGGGATTGTG	CACGTTTCTG	CCAAAGATAA
Gr75	ACATTTGACA	TTGATGCCAA	TGGGATAGTA	CATGTTTCTG	CTAAAGATAA
	1611				1660
Mot1	AGGCACTGGT	CGTGAGCAAC	AGATTGTAAT	CCAGTCTTCT	GGTGGATTAA
Mot2	AGGCACTGGT	CGTGAGCAAC	AGATTGTAAT	CCAGTCTTCT	GGTGGATTAA
Mot3	AGGCACTGGT	CGTGAGCAAC	AGATTGTAAT	CCAGTCTTCT	GGTGGATTAA
Pbp74	AGGCACTGGT	CGTGAGCAAC	AGATTGTAAT	CCAGTCTTCT	GGTGGATTAA
Gr75	AGGCACAGGA	CGTGAGCAGC	AGATTGTAAT	CCAGTCTTCT	GGTGGATTAA
	1661				1710
Mot1	GCAAAGATGA	TATTGAAAAAT	ATGGTTAAAA	ATGCAGAGAA	GTACGCTGAG
Mot2	GCAAAGATGA	TATTGAAAAAT	ATGGTTAAAA	ATGCAGAGAA	GTACGCTGAG
Mot3	GCAAAGATGA	TATTGAAAAAT	ATGGTTAAAA	ATGCAGAGAA	GTACGCTGAG
Pbp74	GCAAAGATGA	TATTGAAAAAT	ATGGTTAAAA	ATGCAGAGAA	GTACGCTGAG
Gr75	GCAAAGATGA	TATTGAAAAAT	ATGGTTAAAA	ATGCAGAGAA	ATATGCTGAA
	1711				1760
Mot1	GAAGACCGCA	GGAAGAAGGA	ACGTGTTGAA	GCAGTTAATA	TGGCTGAAGG
Mot2	GAAGACCGCA	GGAAGAAGGA	ACGTGTTGAA	GCAGTTAATA	TGGCTGAAGG
Mot3	GAAGACCGCA	GGAAGAAGGA	ACGTGTTGAA	GCAGTTAATA	TGGCTGAAGG
Pbp74	GAAGACCGCA	GGAAGAAGGA	ACGTGTTGAA	GCAGTTAATA	TGGCTGAAGG
Gr75	GAAGACCGGC	GAAAGAAGGA	ACGAGTTGAA	GCAGTTAATA	TGGCTGAAGG
	1761				1810
Mot1	AATTATTCAT	GACACAGAAA	CCAAGATGGA	AGAATTTAAG	GACCAGTTGC
Mot2	AATTATTCAT	GACACAGAAA	CCAAGATGGA	AGAATTTAAG	GACCAGTTGC
Mot3	AATTATTCAT	GACACAGAAA	CCAAGATGGA	AGAATTTAAG	GACCAGTTGC
Pbp74	AATTATTCAT	GACACAGAAA	CCAAGATGGA	AGAATTTAAG	GACCAGTTGC
Gr75	AATCATTCAC	GACACAGAAA	CCAAGATGGA	AGAATTC AAG	GACCAATTAC
	1811				1960
Mot1	CTGCTGATGA	GTGCAACAAG	CTAAAGGAAG	AGATTTCCAA	A GTGAGAGCG
Mot2	CTGCTGATGA	GTGCAACAAG	CTAAAGGAAG	AGATTTCCAA	A ATGAGAGCG
Mot3	CTGCTGATGA	GTGCAACAAG	CTAAAGGAAG	AGATTTCCAA	A ATGAGAGCG
Pbp74	CTGCTGATGA	GTGCAACAAG	CTAAAGGAAG	AGATTTCCAA	A ATGAGAGCG
Gr75	CTGCTGATGA	GTGCAACAAG	CTGAAAGAAG	AGATTTCCAA	AATGAGGGAG

	1861				1910
Mot1	CTCCTTGCT C	GAAAGGACAG	TGAGACAGGA	GAGAACATCA	GGCAGGCAGC
Mot2	CTCCTTGCT G	GAAAGGACAG	TGAGACAGGA	GAGAACATCA	GGCAGGCAGC
Mot3	CTCCTTGCT G	GAAAGGACAG	TGAGACAGGA	GAGAACATCA	GGCAGGCAGC
Pbp74	CTCCTTGCT G	GAAAGGACAG	TGAGACAGGA	GAGAACATCA	GGCAGGCAGC
Gr75	CTCCTGGCTA	GAAAAGACAG	CGAAACAGGA	GAAAATATTA	GACAGGCAGC
	1911				1960
Mot1	ATCTTCC C TA	CAGCAGGCGT	CATTGAAACT	CTTCGAAATG	GCGTACAAAA
Mot2	ATCTTCC C TA	CAGCAGGCGT	CATTGAAACT	CTTCGAAATG	GCGTACAAAA
Mot3	ATCTTCC T TA	CAGCAGGCGT	CATTGAAACT	CTTCGAAATG	GCGTACAAAA
Pbp74	ATCTTCC C TA	CAGCAGGCGT	CATTGAAACT	CTTCGAAATG	GCGTACAAAA
Gr75	ATCCTCTCTT	CAGCAGGCAT	CATTGAAGCT	GTTCGAAATG	GCATACAAAA
	1961				2010
Mot1	AGATGGCATC	TGAACGGGAA	GGTTCTGGAA	GTTCTGGCAC	TGGGGAACAG
Mot2	AGATGGCATC	TGAACGGGAA	GGTTCTGGAA	GTTCTGGCAC	TGGGGAACAG
Mot3	AGATGGCATC	TGAACGGGAA	GGTTCTGGAA	GTTCTGGCAC	TGGGGAACAG
Pbp74	AGATGGCATC	TGAACGGGAA	GGTTCTGGAA	GTTCTGGCAC	TGGGGAACAG
Gr75	AGATGGCATC	TGAGCGAGAA	GGCTCTGGAA	GTTCTGGCAC	TGGGGAACAA
	2011				2060
Mot1	AAGGAAGATC	AGAAGGAAGA	GAAACAGTAA	TCGTGGCAGT	GCATTGTGGA
Mot2	AAGGAAGATC	AGAAGGAAGA	GAAACAGTAA	TCGTGGCAGT	GCATTGTGGA
Mot3	AAGGAAGATC	AGAAGGAAGA	GAAACAGTAA	TCGTGGCAGT	GCAT~~~~~
Pbp74	AAGGAAGATC	AGAAGGAAGA	GAAACAGTAA	TCGTGGCAGT	GCATTGTGGA
Gr75	AAGGAAGATC	AAAAGGAGGA	AAAACAGTAA	TAATAGCAG.	AAATTTTGAA
	2061				2110
Mot1	GCCAGA~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot2	GCCAGA~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Pbp74	GCCAGAAGGA	CATACTATGA	AGCTTGGGAC	TAAAGGGACT	TCCTGAGCAG
Gr75	GCCAGAAGGA	CAACATATGA	AGCTTAGGAG	TGAAGAGACT	TCCTGAGCAG
	2111				2160
Mot1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Pbp74	AAAAGGGGCA	GACTTCAGTC	TTTTTACTGT	ATTTTTCAG	TATTCTATAT
Gr75	.AAATGGGCG	AACTTCAGTC	TTTTTACTGT	GTTTTTCAG	TATTCTATAT
	2161				2210
Mot1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Pbp74	ATAATTTTCCT	TAATATATAA	ACTTAGTGAC	AATTGCTAAC	TCATTTAATG
Gr75	ATAATTTTCCT	TAATTTGTAA	ATTTAGTGAC	CATTAGCTAG	TGATCATTTA

	2211				2260
Mot1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Pbp74	GGTAATAAAG	TCAGCAATAG	CAGGTTCAAA	AAAAAAAAAAA	~~~~~
Gr75	ATGGACAGTG	ATTCTAACAG	TATAAAGTTC	ACAATATTCT	ATGTCCCTAG
	2261				2310
Mot1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Pbp74	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Gr75	CCTGTCATTT	TTCAGCTGCA	TGTAAAAGGA	GGTAGGATGA	ATTGATCATT
	2311				2360
Mot1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Pbp74	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Gr75	ATAAAGATTT	AACTATTTTA	TGCTGAAGTG	ACCATATTTT	CAAGGGGTGA
	2361				2410
Mot1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Pbp74	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Gr75	AACCATCTCG	CACACAGCAA	TGAAGGTAGT	CATCCATAGA	CTTGAAATGA
	2411				2460
Mot1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Pbp74	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Gr75	GACCACATAT	GGGGATGAGA	TCCTTCTAGT	TAGCCTAGTA	CTGCTGTACT
	2461				2510
Mot1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Pbp74	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Gr75	GGCCTGTATG	TACATGGGGT	CCTTCAACTG	AGGCCTTGCA	AGTCAAGCTG
	2511				2560
Mot1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Pbp74	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Gr75	GCTGTGCCAT	GTTTGTAGAT	GGGGCAGAGG	AATCTAGAAC	AATGGGAAAC

	2561				2610
Mot1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Pbp74	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Gr75	TTAGCTATTT	ATATTAGGTA	CAGCTATTAA	AACAAGGTAG	GAATGAGGCT
	2611				2660
Mot1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Pbp74	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Gr75	AGACCTTTAA	CTTCCCTAAG	GCATACTTTT	CTAGCTACCT	TCTGCCCTGT
	2661				2710
Mot1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Pbp74	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Gr75	GTCTGGCACC	TACATCCTTG	ATGATTGTTC	TCTTACCCAT	TCTGGAATTT
	2711				2757
Mot1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Mot3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Pbp74	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
Gr75	TTTTTTTTTT	AAATAAATAC	AGAAAGCAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAA

Abbildung 59: Vergleich der Nukleotidsequenzen von Mortalin (mot-1 und mot-2) aus der Maus [166 und 167], von PBP74 aus der Maus [42], von GR75 (humane Sequenz) [42] und mot-3 (TA-Klonierung auf RNA von EL4-6.1). Die Positionen, wo Unterschiede zwischen mot-1, mot-2, mot-3 und PBP74 festzustellen sind, sind durch fette Schreibweise markiert.

	1				50
Mot1	MISASRAAAA	RLVGTAASRS	PAAARPQDGW	NGLSHEAFRF	VSRRDYASEA
Mot2	MISASRAAAA	RLVGTAASRS	PAAARPQDGW	NGLSHEAFRF	VSRRDYASEA
Mot3	MISASRAAAA	RLVGTAASRS	PAAARPQDGW	NGLSHEAFRF	VSRRDYASEA
Pbp74	MISASRAAAA	RLVGTAASRS	PAAARPQDGW	NGLSHEAFRF	VSRRDYASEA
Gr75	MISASRAAAA	RLVGAAASRG	PTAARHQDSW	NGLSHEAFRL	VSRRDYASEA
	51				100
Mot1	IKGAVVGIDL	GTTNSCVAVM	EGKQAKVLEN	AEGARTTPSV	VAFTADGERL
Mot2	IKGAVVGIDL	GTTNSCVAVM	EGKQAKVLEN	AEGARTTPSV	VAFTADGERL
Mot3	IKGAVVGIDL	GTTNSCVAVM	EGKQAKVLEN	AEGARTTPSV	VAFTADGERL
Pbp74	IKGAVVGIDL	GTTNSCVAVM	EGKQAKVLEN	AEGARTTPSV	VAFTADGERL
Gr75	IKGAVVGIDL	GTTNSCVAVM	EGKQAKVLEN	AEGARTTPSV	VAFTADGERL

	101				150
Mot1	VGMPA K RQAV	TNPNNTFYAT	KR I IGRRYDD	PEVQKDTKNV	PFKIVRASNG
Mot2	VGMPA K RQAV	TNPNNTFYAT	KR I IGRRYDD	PEVQKDTKNV	PFKIVRASNG
Mot3	VGMPA K RQAV	TNPNNTFYAT	KR L IGRRYDD	PEVQKDTKNV	PFKIVRASNG
Pbp74	VGMPA R RQAV	TNPNNTFYAT	KR L IGRRYDD	PEVQKDTKNV	PFKIVRASNG
Gr75	VGMPAKRQAV	TNPNNTFYAT	KRLIGRRYDD	PEVQKDIKNV	PFKIVRASNG
	151				200
Mot1	DAWVEAHGKL	YSPSQIGAFV	LMKMKETAEN	YLGHTAKNAV	ITVPAYFNDS
Mot2	DAWVEAHGKL	YSPSQIGAFV	LMKMKETAEN	YLGHTAKNAV	ITVPAYFNDS
Mot3	DAWVEAHGKL	YSPSQIGAFV	LMKMKETAEN	YLGHTAKNAV	ITVPAYFNDS
Pbp74	DAWVEAHGKL	YSPSQIGAFV	LMKMKETAEN	YLGHTAKNAV	ITVPAYFNDS
Gr75	DAWVEAHGKL	YSPSQIGAFV	LMKMKETAEN	YLGHTAKNAV	ITVPAYFNDS
	201				250
Mot1	QRQATKDAGQ	ISGLNVLRVI	NEPTAAALAY	GLDKSEDKVI	AVYDLGGGTF
Mot2	QRQATKDAGQ	ISGLNVLRVI	NEPTAAALAY	GLDKSEDKVI	AVYDLGGGTF
Mot3	QRQATKDAGQ	ISGLNVLRVI	NEPTAAALAY	GLDKSEDKVI	AVYDLGGGTF
Pbp74	QRQATKDAGQ	ISGLNVLRVI	NEPTAAALAY	GLDKSEDKVI	AVYDLGGGTF
Gr75	QRQATKDAGQ	ISGLNVLRVI	NEPTAAALAY	GLDKSEDKVI	AVYDLGGGTF
	251				300
Mot1	DISILEIQKG	VFEVKSTNGD	TFLGGEDFDQ	ALLRHIVKEF	KRETGVDLTK
Mot2	DISILEIQKG	VFEVKSTNGD	TFLGGEDFDQ	ALLRHIVKEF	KRETGVDLTK
Mot3	DISILEIQKG	VFEVKSTNGD	TFLGGEDFDQ	ALLRHIVKEF	KRETGVDLTK
Pbp74	DISILEIQKG	VFEVKSTNGD	TFLGGEDFDQ	ALLRHIVKEF	KRETGVDLTK
Gr75	DISILEIQKG	VFEVKSTNGD	TFLGGEDFDQ	ALLRHIVKEF	KRETGVDLTK
	301				350
Mot1	DNMALQRVRE	AAEKAKCELS	SSVQTDINLP	YLTMDASGPK	HLNMKLTRAQ
Mot2	DNMALQRVRE	AAEKAKCELS	SSVQTDINLP	YLTMDASGPK	HLNMKLTRAQ
Mot3	DNMALQRVRE	AAEKAKCELS	SSVQTDINLP	YLTMDASGPK	HLNMKLTRAQ
Pbp74	DNMALQRVRE	AAEKAKCELS	SSVQTDINLP	YLTMDASGPK	HLNMKLTRAQ
Gr75	DNMALQRVRE	AAEKAKCELS	SSVQTDINLP	YLTMDSSGPK	HLNMKLTRAQ
	351				400
Mot1	FEGIVTDLIK	RTIAPCQKAM	QDAEVSKSDI	GEVILVGGMT	RMPKVQQTVQ
Mot2	FEGIVTDLIK	RTIAPCQKAM	QDAEVSKSDI	GEVILVGGMT	RMPKVQQTVQ
Mot3	FEGIVTDLIK	RTIAPCQKAM	QDAEVSKSDI	GEVILVGGMT	RMPKVQQTVQ
Pbp74	FEGIVTDLIK	RTIAPCQKAM	QDAEVSKSDI	GEVILVGGMT	RMPKVQQTVQ
Gr75	FEGIVTDLIR	RTIAPCQKAM	QDAEVSKSDI	GEVILVGGMT	RMPKVQQTVQ
	401				450
Mot1	DLFGRAPSKA	VNPDEAVAIG	AAIQGGVLAG	DVTDVLLLLDV	TPLSLGIETL
Mot2	DLFGRAPSKA	VNPDEAVAIG	AAIQGGVLAG	DVTDVLLLLDV	TPLSLGIETL
Mot3	DLFGRAPSKA	VNPDEAVAIG	AAIQGGVLAG	DVTDVLLLLDV	TPLSLGIETL
Pbp74	DLFGRAPSKA	VNPDEAVAIG	AAIQGGVLAG	DVTDVLLLLDV	TPLSLGIETL
Gr75	DLFGRAPSKA	VNPDEAVAIG	AAIQGGVLAG	DVTDVLLLLDV	TPLSLGIETL

	451				500
Mot1	GGVFTKLINR	NTTIPTKKSQ	VFSTAADGQT	QVEIKVCQGE	REMAGDNKLL
Mot2	GGVFTKLINR	NTTIPTKKSQ	VFSTAADGQT	QVEIKVCQGE	REMAGDNKLL
Mot3	GGVFTKLINR	NTTIPTKKSQ	VFSTAADGQT	QVEIKVCQGE	REMAGDNKLL
Pbp74	GGVFTKLINR	NTTIPTKKSQ	VFSTAADGQT	QVEIKVCQGE	REMAGDNKLL
Gr75	GGVFTKLINR	NTTIPTKKSQ	VFSTAADGQT	QVEIKVCQGE	REMAGDNKLL
	501				550
Mot1	GQFTLIGIPP	APRGVPQIEV	T FDIDANGIV	HVSAKDKGTG	REQQIVIQSS
Mot2	GQFTLIGIPP	APRGVPQIEV	T FDIDANGIV	HVSAKDKGTG	REQQIVIQSS
Mot3	GQFTLIGIPP	APRGVPQIEV	T FDIDANGIV	HVSAKDKGTG	REQQIVIQSS
Pbp74	GQFTLIGIPP	APRGVPQIEV	T S DIDANGIV	HVSAKDKGTG	REQQIVIQSS
Gr75	GQFTLIGIPP	APRGVPQIEV	TFDIDANGIV	HVSAKDKGTG	REQQIVIQSS
	551				600
Mot1	GGLSKDDIEN	MVKNAEKYAE	EDRRKKERVE	AVNMAEGIIH	DTETKMEEFK
Mot2	GGLSKDDIEN	MVKNAEKYAE	EDRRKKERVE	AVNMAEGIIH	DTETKMEEFK
Mot3	GGLSKDDIEN	MVKNAEKYAE	EDRRKKERVE	AVNMAEGIIH	DTETKMEEFK
Pbp74	GGLSKDDIEN	MVKNAEKYAE	EDRRKKERVE	AVNMAEGIIH	DTETKMEEFK
Gr75	GGLSKDDIEN	MVKNAEKYAE	EDRRKKERVE	AVNMAEGIIH	DTETKMEEFK
	601				650
Mot1	DQLPADECNK	LKEEISK V RA	LLARKDSETG	ENIRQAASSL	QQASLKL FEM
Mot2	DQLPADECNK	LKEEISK M RA	LLAGKDSETG	ENIRQAASSL	QQASLKL FEM
Mot3	DQLPADECNK	LKEEISK M RA	LLAGKDSETG	ENIRQAASSL	QQASLKL FEM
Pbp74	DQLPADECNK	LKEEISK M RA	LLAGKDSETG	ENIRQAASSL	QQASLKL FEM
Gr75	DQLPADECNK	LKEEISKMRE	LLARKDSETG	ENIRQAASSL	QQASLKL FEM
	651		679		
Mot1	AYKKMASERE	GSGSSGTGEQ	KEDQKEEKQ*		
Mot2	AYKKMASERE	GSGSSGTGEQ	KEDQKEEKQ*		
Mot3	AYKKMASERE	GSGSSGTGEQ	KEDQKEEKQ*		
Pbp74	AYKKMASERE	GSGSSGTGEQ	KEDQKEEKQ*		
Gr75	AYKKMASERE	GSGSSGTGEQ	KEDQKEEKQ*		

Abbildung 60: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Mot-3, Mot-1 und Mot-2 [166 und 167], PBP74 [42] sowie GR75 [42]. Das prozessierte Protein beginnt mit der Position 47. Positionen, wo Unterschiede zwischen den Sequenzen von Mot-1, Mot-2, Mot-3 und PBP74 auftreten, sind durch fette Schreibweise herausgehoben.

LEBENS LAUF

Name: Gudrun S a c h t
Geburtsdatum: 14.02.1968
Geburtsort: Braunschweig
Eltern: Dr.-Ing. Hans Otto Sacht, Hörstel
Christa-Maria Sacht, geb. Hansen
Familienstand: ledig

Schulbildung: 1974 - 1978
Wilhelm-Raabe-Grundschule, Wolfenbüttel
1978 - 1980
Orientierungsstufe, Wolfenbüttel
1980 - 1987
Theodor-Heuss-Gymnasium, Wolfenbüttel
Abitur im Mai 1987

Berufsausbildung: *Sommersemester 1988 - Wintersemester 1989/90*
Musikstudium (Hauptfach Oboe), Hochschule der Künste
Berlin
Zwischenprüfung im Februar 1990
Sommersemester 1990 - Wintersemester 1994/95
Biologiestudium, Freie Universität Berlin
Vordiplomprüfungen im Sommersemester 1992
Diplomprüfungen im Februar 1994
März 1994 - Februar 1995
Diplomarbeit in der Gesellschaft für Biotechnologische
Forschung mbH, Braunschweig-Stöckheim in der
Abteilung "Enzymologie" mit dem Thema: Reinigung
und Charakterisierung einer Phospholipase C aus *Listeria*
monocytogenes

Berufstätigkeit: *März 1995 - Februar 1998*
wissenschaftliche Hilfskraft (Doktorandin) in der
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH,
Braunschweig-Stöckheim in der Arbeitsgruppe
"Physiologische Chemie" der TU Braunschweig unter der
Leitung von Herrn Prof. Dr. L. Flohé
März 1996 - November 1996
wissenschaftliche Arbeit im Rahmen der Dissertation am
Deutschen Institut für Ernährungsforschung in Potsdam-
Rehbrücke in der Arbeitsgruppe "Vitamine und
Atherosklerose"